

**EVALUACIÓN DE PÉPTIDOS SINTÉTICOS SOBRE BACTERIAS, LEVADURAS
Y MOHOS**

Elizabeth Correa Gómez

**Tesis de Grado presentada para optar al Título de
Magíster en Ciencias - Biotecnología**

DIRECTOR

Sergio Orduz Peralta Biólogo, MSc, PhD

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE MEDELLÍN

FACULTAD DE CIENCIAS

2012

CONTENIDO

RESUMEN	8
1. INTRODUCCIÓN	9
2. MARCO TEÓRICO	13
2.1. Resistencia a los antimicrobianos	13
2.1.1. Resistencia a los antibacterianos	13
2.1.2. Resistencia a los antimicóticos	16
2.2. Resistencia a los agroquímicos o pesticidas	18
2.3. Generalidades de los péptidos	19
2.3.1. Generalidades de las estructuras de los péptidos	20
2.3.1.1. Hélices α	20
2.3.1.2. Láminas β	21
2.3.1.3. Giros y bucles	21
2.4. Péptidos antimicrobianos (PAMs)	22
2.4.1. Clasificación de los PAMs	23
2.4.1.1. Clasificación según su estructura secundaria o terciaria	23
2.4.1.1.1. Helices α	24
2.4.1.1.2. Láminas β	24
2.4.1.1.3. Otras conformaciones	25
2.4.1.2 Clasificación según su actividad biológica	25
2.4.2. Características evolutivas de los PAMs	26
2.4.3. Características físicoquímicas determinantes de la actividad antimicrobiana	27
2.4.3.1. Carga	27
2.4.3.2. Anfipaticidad	28
2.4.3.3. Hidrofobicidad	28
2.4.3.4. Tendencia estructural	29
2.4.4. PAMs sintéticos y péptidos miméticos	29

2.4.4.1. Péptidos sintéticos	29
2.4.4.2. Péptidos miméticos	30
2.4.4.3. PAMs con D-aminoácidos	30
2.4.4.4. PAMs con residuos peptoides	31
2.4.4.5. PAMs cíclicos	31
2.4.4.6. PAMs con polietilglicol	31
2.5. Mecanismo de acción de los PAMs	32
2.5.1. Mecanismo mediado por receptor	32
2.5.2. Mecanismos no mediados por receptor	33
2.5.3. Características de las membranas blanco determinantes en la selectividad	33
2.5.4. Modelos propuestos de los modos de acción de los PAMs	35
2.6 Bases de datos de PAMs	38
3. OBJETIVOS	39
3.1. Objetivo general	39
3.2. Objetivos específicos	39
4. METRIALES Y METODOS	40
4.1. Péptidos utilizados	40
4.2. Ensayos de actividad antimicrobiana	42
4.2.1 Actividad antibacteriana y CIM	42
4.2.2. Actividad antifúngica y CIM	42
4.3. Actividad hemolítica	43
4.4. Permeabilidad de las membranas microbianas	44
4.5. Análisis estadístico	45
5. RESULTADOS	46
5.1. Actividad antimicrobiana de los péptidos sintéticos	46

5.2. CIMs para las cepas bacterianas	46
5.2.1. CIM de <i>E. faecalis</i> VR	46
5.2.2. CIM de <i>S. aureus</i> MR	49
5.2.3. CIM de <i>E. coli</i>	50
5.2.4. CIM de <i>R. solanacearum</i>	50
5.3. CIMs para los hongos	51
5.3.1. CIM de <i>C. albicans</i>	51
5.3.2. CIM de <i>F. oxysporum</i>	53
5.4. Actividad hemolítica	54
5.5. Permeabilidad de las membranas microbianas	56
5.5.1. Permeabilidad de las membranas bacterianas	56
5.5.2. Permeabilidad de las membranas fúngicas	64
6. DISCUSIÓN	70
7. CONCLUSIÓN	78
AGRADECIMIENTOS	80
BIBLIOGRAFÍA	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los PAMs según APD, teniendo en cuenta su actividad biológica	26
Tabla 2. Código, longitud, carga y peso molecular de los péptidos evaluados	41
Tabla 3. CIM en unidades μM de los péptidos sintéticos variantes de P1 sobre las cepas microbianas evaluadas	47
Tabla 4. Porcentaje de supervivencia estimada de <i>E. faecalis</i> VR, <i>S. aureus</i> MR, <i>E. coli</i> y <i>R. solanacearum</i> tratados con las diferentes concentraciones de los péptidos sintéticos activos, determinado por ANOVA y la prueba Tukey	48
Tabla 5. Porcentaje de supervivencia estimada de <i>C. albicans</i> y <i>F. oxysporum</i> tratados con las diferentes concentraciones de los péptidos sintéticos activos, determinado por ANOVA y la prueba Tukey	52
Tabla 6. Actividad hemolítica de los péptidos sintéticos con actividad antimicrobiana	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplo de una hélice α	20
Figura 2. Esquema rueda helicoidal de un péptido que forma hélice α	20
Figura 3. Ejemplo de una lámina beta plegada	21
Figura 4. Distribución de los organismos origen de los PAMs.	22
Figura 5. Estructura secundaria de algunos PAMs.	24
Figura 6. Constituyentes lipídicos de membranas procariotas y eucariotas.	34
Figura 7. Esquema de los componentes de las membranas animales y bacterianas.	35
Figura 8. Mecanismos propuestos para la actividad de los péptidos antimicrobianos.	36
Figura 9. Actividad antibacterial del péptido P26D en <i>E. faecalis</i> VR.	49
Figura 10. Actividad antibacterial de los péptido P26D, WP1W y P1D sobre <i>S. aureus</i> MR	49
Figura 11. Actividad antibacterial de los péptidos R_P1, P26CL, R_WP1, R_P1W, P1D y P26D sobre <i>E. coli</i>	50
Figura 12. Actividad antibacterial de los péptidos P1D, P1X y P26D sobre <i>R. solanacearum</i>	51
Figura 13. Actividad antifúngica de los péptidos DERMASEPTINA, P1CL, P1CD y P26CL en <i>C. albicans</i> .	53
Figura 14. Actividad antibacterial de los péptidos DERMASEPTINA, P1X, P1CD, P26D, P1D y P26 en <i>F. oxysporum</i>	53
Figura 15. Microscopia de fluorescencia de <i>E. faecalis</i> VR, con Sytox green.	57

Figura 16. Evaluación cuantitativa de la permeabilización de la membrana de <i>E. faecalis</i> VR.	57
Figura 17. Evaluación cuantitativa de la permeabilización de la membrana de <i>S. aureus</i> MR.	58
Figura 18. Microscopia de fluorescencia de <i>S. aureus</i> MR con Sytox green	59
Figura 19. Microscopia de fluorescencia de <i>E.coli</i> con Sytox green	61
Figura 20. Evaluación cuantitativa de la permeabilización de la membrana de <i>E.coli</i>	62
Figura 21. Microscopia de fluorescencia de <i>R. solanacearum</i> con Sytox green	63
Figura 22. Evaluación cuantitativa de la permeabilización de la membrana de <i>R. solanacearum</i> .	64
Figura 23. Evaluación cuantitativa de la permeabilización de la membrana de <i>C. albicans</i> ..	65
Figura 24. Microscopia de fluorescencia de <i>C. albicans</i> con Sytox green	66
Figura 25. Evaluación cuantitativa de la permeabilización de la membrana de <i>F. oxysporum</i> .	67
Figura 26. Microscopia de fluorescencia de <i>F. oxysporum</i> con Sytox green.	68

RESUMEN

Ante el creciente surgimiento de microorganismos resistentes tanto en el ámbito médico como el agrícola se ha intentado desarrollar estrategias para el control de estos patógenos, algunas más eficaces que otras, una de las mejores alternativas contempla la búsqueda de nuevos agentes con actividad biológica antimicrobiana con un modo de acción eficaz al que los microorganismos no generen resistencia con facilidad y que tengan un impacto científico, económico y social. Los péptidos antimicrobianos (PAMs) son moléculas producidas por la mayoría de seres vivos como mecanismo de defensa contra patógenos. Se han descrito, caracterizado y sintetizado numerosos PAMs con actividades antimicrobianas excelentes que a largo plazo pueden ser candidatos potenciales para ser usados como terapias para el control de microorganismos patógenos de importancia en la salud y en la agricultura. En este trabajo se analizaron 21 PAMs sintéticos, 19 de ellos derivados de una toxina insecticida Cry11Bb de *Bacillus thuringiensis* serovar. *medellin*. La evaluación de la actividad antimicrobiana fue realizada sobre bacterias como *Enterococcus faecalis* Vancomicina Resistente (VR), *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente (MR), *Escherichia coli* y *Ralstonia solanacearum* y hongos como *Candida albicans* y *Fusarium oxysporum*, adicionalmente se evaluó si los péptidos activos inducían la permeabilización de la membrana plasmática con de los microorganismos utilizando el colorante fluorescente Sytox green y se determinó su actividad hemolítica sobre eritrocitos humanos. Los dos péptidos más activos fueron P26D y P1D, estos tuvieron una buena actividad sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas y hongos tipo mohos. En cuanto al modo de acción de los péptidos, se encontró, que los péptidos activos frente a las bacterias Gram positivas generaron evidentemente una rápida permeabilización de la membrana, en las bacterias Gram negativas este efecto no fue constante ya que no todos los péptidos produjeron daños evidentes en la membrana, en la levadura y hongo filamentoso no se produjo permeabilización de la membrana, lo que sugiere un mecanismo de acción diferente al el daño directo de la membrana plasmática. Estos resultados demuestran la promisorio utilidad de estos péptidos para el control de patógenos que pueda aportar al desarrollo de nuevas estrategias de control, diferentes a las utilizadas tradicionalmente, ya que son altas las tasas de resistencia y toxicidad, en el caso de los agroquímicos, que se presentan en la actualidad

1. INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de la penicilina en 1928 fue el primer paso a una gran revolución en el tratamiento de las enfermedades infecciosas que agobiaban a la humanidad. A partir de este momento se han desarrollado innumerables fármacos de origen natural y sintético. De la mano de la evolución de los antibióticos, las bacterias también se han transformado utilizando múltiples mecanismos bioquímicos, genéticos y celulares como estrategias para sobrevivir y ser resistentes a los antibióticos (Davies & Davies, 2010). Además, el uso indiscriminado de la terapia antibiótica para el control de infecciones, así como la disminución en la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos activos contra estos microorganismos resistentes, están llevando a una crisis de salud pública (Andersson & Hughes, 2012). En los últimos 40 años sólo tres nuevas clases de antibióticos estructurales se han introducido en la práctica médica (oxazolidinonas, estreptograminas y el lipopéptido daptomicina) (Jacqueline et al., 2004; Cabrera et al., 2007; Cabrera et al., 2011).

En los estudios epidemiológicos realizados en América Latina, principalmente en Colombia, se ha encontrado que ésta es una de las regiones con más alta incidencia de brotes de infecciones asociadas al cuidado de la salud, producidos por bacterias que presentan resistencia a múltiples antibióticos (Cabrera et al., 2007). Los reportes crecientes de cepas microbianas resistentes frente a diversos antibióticos han generado alarmas en el sistema de salud pública. Entre los casos más destacados en este aspecto, se encuentran aislamientos de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* de origen hospitalario con resistencia a fármacos de amplio espectro, bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* con Beta lactamasas de espectro extendido, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* (Cabrera et al., 2007; Cabrera et al., 2011; Rodríguez et al., 2011). Otros microorganismos reportados como resistentes con menor frecuencia son *Salmonella* sp., *Vibrio cholerae* y *Shigella* sp. (Arias B & Meza L, 2004).

En la agricultura, la utilización de agroquímicos es un problema aún más alarmante, ya que el desarrollo de resistencia por parte de bacterias y hongos fitopatógenos está creciendo de forma elevada, llevando a que los agricultores apliquen químicos de amplio espectro en

mayor concentración para tratar de salvar sus cultivos, generando finalmente problemas de salud por exceso de químicos residuales tóxicos en vegetales de consumo (Muñoz, 2008). Por otro lado, el uso de antibióticos en ganadería y acuicultura ocasiona la presencia de residuos de antibióticos en la carne de los animales y permite la selección de bacterias resistentes en los intestinos de los animales de consumo humano que conlleva a la transferencia de resistencia a los microorganismos patógenos por exposición directa de los consumidores de estos fármacos (Davies & Davies, 2010; Andersson & Hughes, 2012).

Además, se pueden encontrar microorganismos resistentes en los alimentos de origen vegetal cuando se irrigan con aguas residuales o cuando se aplican antibióticos a los cultivos (Cabrera et al., 2007; Chen et al., 2007; Heuer et al., 2011). A nivel económico el impacto no es menor, ya que estos microorganismos resistentes causan cuantiosas pérdidas en los cultivos.

Esta problemática plantea la necesidad de utilizar estrategias alternas que tengan impacto científico, económico, ambiental y social, y que contemplen la búsqueda de nuevos agentes con actividad biológica antimicrobiana con un modo de acción diferente. Se ha reportado el hallazgo de péptidos antimicrobianos (PAMs) que hacen parte de el sistema de defensa de prácticamente todas las formas de vida y que tienen propiedades bactericidas, fungicidas y citolíticas, además de propiedades inmunomoduladoras (Marshall y Arenas, 2003).

La ventaja de los PAMs como estrategias de control de patógenos es que, dada la relativa inespecificidad de su mecanismo, no es fácil para los patógenos desarrollar mutantes resistentes, ya que esto requeriría cambios sustanciales en la composición lipídica de sus membranas celulares (Chen et al., 2005; Nizet, 2006). Adicionalmente, los PAMs han coevolucionado con los microorganismos a lo largo de millones de años, lo cual se debe principalmente a su mecanismo de acción (Yeaman & Yount, 2003). Este mecanismo se basa en la interacción con la membrana plasmática de los microorganismos patógenos, formando canales iónicos y poros que aumentan la permeabilidad, causando perturbación en la membrana celular y en las estructuras y funciones intracelulares, llevando a autólisis o a la apoptosis (Yeaman & Yount, 2003). Un ejemplo de esto es son los péptidos derivados

de la ubiquicidina, reportados por Brouwer et al. (2006), que presentaron una alta actividad frente a cepas de *S. aureus* Meticilino Resistente (MR); de esta forma, los PAMs pueden representar el avance terapéutico y convertirse candidatos para implementación de tratamientos eficaces para contrarrestar la resistencia microbiana.

En los últimos años además de la búsqueda de péptidos en gran variedad de organismos vivos, se han obtenido nuevos PMAs mediante síntesis química, generado análogos de péptidos ya existentes o diseñando nuevos péptidos partiendo de novo. De esta manera se ha tratado de mejorar su actividad antimicrobiana ampliando el espectro de acción y disminuyendo la citotoxicidad; como resultado, algunos péptidos sintéticos a los que se les varió la hidrofobicidad y carga, mostraron ser más activos contra *Streptococcus mutans* (He et al., 2007). Un enantiómero análogo de la pleurocidina, diseñado para ser resistente a proteólisis por sustitución con D aminoácidos mostró gran actividad antibacteriana y menor actividad hemolítica en comparación con la forma L (Lee & Lee, 2008). Así mismo híbridos sintéticos de cecropina y melitina han demostrado mayor actividad que los péptidos individuales contra *Mycobacterium smegmatis* (Zerbini et al., 2006). De igual forma, Qi et al., (2010), reportaron péptidos cortos de máximo 11 residuos, análogos al péptido BP76 que mostraron mayor actividad contra bacterias, levaduras y hongos filamentosos, siendo menos citotóxicos que la molécula original.

En la actualidad existen numerosas bases de datos de péptidos antimicrobianos de diferente origen, que incluye, péptidos antimicrobianos en general (Whitmore & Wallace, 2004; Fjell et al. 2007; Seebah et al., 2007; Wang et al. 2009; Thomas et al., 2010; Hammami et al., 2010), secuencias de proteínas cíclicas (Wang et al., 2008), de péptidos antimicrobianos de camarones (Gueguen et al., 2006), péptidos antimicrobianos derivados de plantas (Hammami et al. 2009).

Igualmente se encuentran bases de datos sobre péptidos antimicrobianos recombinantes (Li & Chen, 2008) y finalmente, de péptidos antimicrobianos sintéticos (Wade & Englund, 2002).

Desde hace algunos años parte del equipo de trabajo, diseñó y evaluó un péptido policatiónico BTM-P1 de 26 aminoácidos, derivado de la protoxina Cry11Bb de *Bacillus thuringiensis* serovar *medellin*, que tiene actividad contra larvas de mosquitos (Lemeshko et al., 2005; Segura et al., 2007). BTM-P1 presentó actividad ionofórica induciendo hinchamiento de mitocondrias de manera potencial-dependiente; además, presentó actividad biológica sobre *Escherichia coli*, *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y otras bacterias (Lemeshko et al., 2005).

En este sentido, la presente investigación tuvo como objetivo principal evaluar la actividad antimicrobiana de diferentes péptidos sintéticos diseñados por el grupo de investigación, análogos del péptido BTM-P1, incluyendo algunos péptidos con residuos en conformación D en lugar de L, tratando así, de que sean menos susceptibles a proteasas. Cabe resaltar que la propuesta es innovadora, en el contexto de la investigación de péptidos antimicrobianos derivados de toxinas insecticidas, ya que hasta el momento no hay publicaciones de este tipo, por lo que es importante estudiar más sobre este tema y poder desarrollar nuevas estrategias para intentar mitigar la problemática de microorganismos resistentes a antibióticos y a los agroquímicos y con su agravante efecto contaminante. En ésta investigación se evaluaron algunos péptidos sintéticos derivados de BTM-P1 sobre diferentes modelos biológicos implicados en esta problemática como son algunas bacterias resistentes a antibióticos, hongos filamentosos y levaduriformes de importancia en salud pública y en la agricultura. Así mismo, se planteó determinar si los péptidos propuestos tienen efecto directo sobre la permeabilidad de la membrana plasmática de los microorganismos evaluados.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Resistencia a los antimicrobianos

La resistencia de los microorganismos a los agentes antimicrobianos es un fenómeno que se viene presentando desde los años 30, se podría decir que desde el momento que fue descubierta la penicilina en 1928. A partir de este momento, se lograron controlar de manera eficiente muchas de las enfermedades infecciosas que atacaban a la humanidad, pero desde este instante los microorganismos al entrar en contacto con los antibióticos empezaron a presentar tolerancia y posteriormente resistencia a los agentes antimicrobianos. Como todos los seres vivos, los microorganismos tienen mecanismos que les permiten sobrevivir a presiones ambientales y desarrollar como aspecto fundamental de la evolución la resistencia a los agentes antimicrobianos que puedan atentar con su sobrevivencia, sin embargo se han reconocido algunos elementos que permiten la sobreexpresión esta característica innata para cualquier organismo (Cabrera, et al. 2007; Davies & Davies, 2010). Dentro de los elementos más determinantes para la aparición de resistencia están los aspectos propios de los organismos como su bioquímica y fisiología y los aspectos externos que están ligados principalmente al uso inadecuado de los agentes antimicrobianos; de todas formas está muy claro que este proceso es continuo y que no se detiene.

2.1.1 Resistencia a los antibacterianos

Los agentes antibacterianos se clasifican según la forma de acción, de la siguiente forma; inhibición de la síntesis de la pared bacteriana (β -lactámicos y glicopéptidos), inhibición de la síntesis de proteínas (macrólidos y tetraciclinas), interferencia con la síntesis de los ácidos nucleicos (fluoroquinolonas y rifampicinas), inhibición de rutas metabólicas (trimetoprim-sulfametoxazole) y daño de la estructura de la membrana bacteriana (polimixinas y daptomicina) (Tenover, 2006).

Se ha generado un gran problema de salud pública por las altas de tasas de resistencia presentadas por diferentes cepas bacterianas que antes solo estaban restringidas en el ámbito hospitalario, pero últimamente se conoce que mutantes diferentes, por ejemplo cepas de *S. aureus* MR, también están en dispersos en la comunidad, lo que es más preocupante aun, ya que son más difíciles de controlar y pueden generar tasas de morbilidad y mortalidad más altas (Cabrera et al., 2011).

Hay varios factores que favorecen la aparición de cepas resistentes a las terapias antibióticas y casi todos están ligados al uso inadecuado por los humanos. En varias publicaciones se describen las implicaciones ambientales y en la salud humana del uso irracional antibióticos, de tal forma que se genera un círculo vicioso difícil de romper, que inicia de la contaminación de fuentes de agua y suelos con desechos de las fábricas farmacéuticas u hogares, micciones y excrementos de los animales terrestres que son tratados con antibióticos y el uso de los mismos en la acuicultura. El agua contaminada puede ser consumida directamente por humanos y animales o ser utilizada para el riego de cultivos de vegetales que luego son consumidos también por humanos y animales. Adicionalmente los humanos consumen productos derivados de animales como carne o leche que presentan también altas concentraciones de estos fármacos (Tenover, 2006; Davies & Davies, 2010; Andersson & Hughes, 2012). Por otro lado, los humanos contaminamos con nuestra orina fuentes de agua teniendo en cuenta que entre el 20 y el 90%, dependiendo del antibiótico, se excretan por la orina aun en forma activa (Andersson & Hughes, 2012). Todo esto genera un ambiente con alta presión de selección, donde las bacterias están en contacto permanente con diferentes concentraciones de numerosos antibióticos, lo que conlleva a que activen y desarrollen mecanismos de resistencia (Cabrera et al., 2007).

Entre las principales patógenos que se han reportado resistentes y causantes de infecciones infecciones asociadas al cuidado de salud, se encuentran cepas de bacterias Gram positivas como, *Staphylococcus aureus* con resistencia a la meticilina (MR) y *Enterococcus* spp. resistentes a vancomicina (VR) y bacterias Gram negativas como, *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y otras enterobacterias

menos frecuentes como *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis* y *Enterobacter* sp. productoras de β -lactamasas de espectro extendido (Cabrera et al., 2011; Rodríguez-badillo et al., 2011). La distribución de estos patógenos a nivel mundial y en Colombia varía entre el 2 y 37% y que se está incrementando a pesar de los intentos de control por las entidades de salud de cada país. *S. aureus* MR es el patógeno con las frecuencias de resistencia más altas reportadas y se distribuye no solo a nivel hospitalario sino también en la comunidad, tanto rural como urbana (Cabrera et al., 2011). Otra bacteria que ha presentado altas tasas de resistencia frente a varios antibióticos es *Mycobacterium tuberculosis*, uno de los primeros casos fue reportado en 1984, y aunque para el tratamiento de la tuberculosis se utilizan cocteles de antibióticos, siguen apareciendo cepas completamente resistentes a uno o varios antibióticos lo que hace ineficientes a los esquemas terapéuticos (Davies & Davies, 2010).

Las bacterias presentan múltiples formas de resistencia, algunas presentan resistencia intrínseca o natural sobre algunos fármacos y otras es de forma adquirida. Dentro de los modos de resistencia adquirida más descritos están. 1. Adquisición de genes que codifican para enzimas que inactivan los fármacos antes de que puedan cumplir su efecto, el ejemplo más claro son las β -lactamasas, que han sido clasificadas dependiendo su espectro de acción, unas de ellas son las penicilasas, cefalosporinasas, carbapenemasas, etc. 2. Formación de bombas de flujo que les permiten la eliminación del agente antimicrobiano antes que pueda unirse a su blanco. 3. Adquisición de genes que pueden intervenir en rutas metabólicas produciendo cambios en la pared, un ejemplo de esto es la disminución de la formación de porinas o generación de cambios en los receptores (Delcours, 2009). Para los tres mecanismos mencionados las bacterias utilizan varias estrategias genéticas, algunas se basan principalmente en la transferencia de genes de resistencia mediante plásmidos y su estabilización en el cromosoma bacteriano por medio de integrones y otras realizan mutaciones en genes de importancia o modificaciones a nivel traduccional (Tenover, 2006; Davies & Davies, 2010). Otro aspecto importante que ha favorecido el desarrollo de resistencia bacteriana es la habilidad que tienen algunas bacterias para formar biofilms o micro colonias, tanto *in vivo* como en instrumentos médicos, que le permiten a las bacterias

escapar de forma eficiente a la acción de los antibióticos (Davies & Davies, 2010; Andersson & Hughes, 2010)

2.1.2. Resistencia a los antimicóticos

El desarrollo y evolución de los antimicóticos no fue tan acelerada como la de los antibacterianos debido a que la evolución misma de las micosis fue menos fluida, ya que inicialmente la mayoría de las infecciones por hongos eran mal diagnosticadas o estaban restringidas solo a nivel superficial, por lo que no eran tratadas o si se realizaba, no se hacía de la forma correcta. Pero con el crecimiento de infecciones como VIH-SIDA o enfermedades como el cáncer que deprimen el sistema inmune, se han incrementado los casos de infecciones micóticas, en ocasiones con cuadros clínicos severos causados por hongos ambientales, antes considerados inocuos. El primer antimicótico descubierto fue la anfotericina B en la década de los 50`s utilizado aun como tratamiento de elección de las infecciones profundas o sistémicas; después de esto, se desarrollaron los demás antifúngicos que se encuentran en el mercado. La clasificación de los antimicóticos está dividida según sus blancos de acción, los cuatro grupos más importantes como son. 1. Los azoles (fluconazol, voriconazol, itraconazol, etc.), la terbinafina, los polienos como la anfotericina B y la nistatina que tienen acción sobre el ergosterol o su síntesis, molécula análoga del colesterol, que forma parte importante y estabilizante de la membrana plasmática. 2. Nikkomicinas y polimyxinas que inhiben la síntesis de quitina, un polisacárido que hace parte de pared de las células fúngicas. 3. Caspofungina y equinocardinas que impiden la síntesis del β 1-3 glucano, también componente importante de las paredes de hongos y 4. La flucitocina que interrumpe la síntesis de ácidos nucleicos ya sea ARN o ADN (Anderson, 2005; Kathiravan et al., 2012).

Dentro de los hongos que se han reportado como resistentes, principalmente a los azoles, se encuentran algunas especies de *Candida*, siendo *C. glabrata* la que presenta mayor frecuencia de resistencia, no solo al fluconazol, sino también a otros antimicóticos como el voriconazol, posaconazol, etc. Los porcentajes de cepas con susceptibilidad disminuida

oscilan entre el 5 y el 17%, dependiendo del antifúngico, por lo que la han catalogado como cepas multidrogoresistentes (Pfaller, 2012). Adicionalmente se han reportado casos de resistencia en *C. albicans*, que es la levadura más frecuentemente encontrada causando infección en humanos, mientras que el resto de especies de *Candida* no *albicans* también han presentado resistencia, aunque con menor frecuencia según los reportes del Instituto Nacional de Cancerología (Rivas et al., 2010). Otra levadura en la que se ha reportado resistencia es *Cryptococcus neoformans*, causante de infecciones oportunistas en pacientes con la inmunidad alterada, para esta levadura las frecuencias de resistencia son más bajas (1 ó 2%), afortunadamente en los últimos años su susceptibilidad ha aumentado gracias a las estrategias epidemiológicas y de salud pública para el control de la problemática (Pfaller, 2012).

Con respecto a los hongos filamentosos, la mayoría de reportes hablan de cepas resistentes al grupo de los azoles. En casi todas las publicaciones mencionan que las diferentes especies de *Aspergillus* spp. son las que presentan mayores frecuencias de resistencia (Pfaller, 2012). Chávez et al., (2010) en un estudio realizado con cepas aisladas a partir de infecciones oportunistas que fueron enfrentadas a diferentes antimicóticos, encontrando porcentajes de resistencia para *Aspergillus* spp. que oscilan entre 3 y 55%; en la misma investigación encontraron una resistencia hasta del 100%, en cepas de *Fusarium* spp. Igualmente se han encontrado cepas de hongos como *Scedosporium* spp. y *Sporotrix schenckii* resistentes, agentes etiológicos principalmente de micosis subcutáneas (Kanafani & Perfect, 2008).

Hay numerosos mecanismos que utilizan los hongos para evadir la acción de los agentes antifúngicos, pero los principales pueden ser resumidos así: 1. Aumento del flujo de moléculas a través de la membrana plasmática mediante la sobreexpresión de transportadores ABC o proteínas facilitadoras de membrana que permiten la eliminación del antimicótico antes de que cumpla su acción. 2. Alteración de la enzima blanco generando cambios en la proteína que impiden la unión del antifúngico o que permiten la inactivación de la molécula blanco de forma alostérica, después de la unión del inhibidor y 3. Alteración del metabolismo al perder una actividad enzimática específica que disminuye

la acumulación de productos tóxicos cuando las células están en contacto con el medicamento (Anderson, 2005; Vandeputte et al., 2012). Sin embargo, aún se desconoce cuáles son los mecanismos de resistencia frente algunos antifúngicos como las morfolinás (Vandeputte et al., 2012)

2.2 Resistencia a los agroquímicos o pesticidas

La resistencia a los agentes antimicrobianos no es un problema que solo concierne al área de la salud; en el sector agrícola el problema no es diferente, y por el contrario, presenta mayores agravantes porque no solo es la creciente resistencia de los microorganismos fitopatógenos a los agroquímicos, sino también la alta contaminación y efectos contraproducentes sobre todo en la salud humana (Muñoz, 2008). Los pesticidas son productos químicos utilizados para el control de enfermedades de los cultivos agrícolas donde se incluyen insectos, hongos, virus, nematodos, bacterias y malezas. Uno de los primeros pesticidas desarrollados fue el DDT, y de ahí en adelante se desarrollaron innumerables químicos con los que se creyó se había ganado la batalla contra las plagas que atacaban a los cultivos; pero al contrario de lo que se pensaba, pocos años después se encontraron organismos con resistencia a diferentes pesticidas, lo que conllevó a cuantiosas pérdidas económicas (Speck-Planche, et al., 2012). En el caso de los fungicidas, se conoce que la resistencia de algunos hongos fitopatógenos puede estar determinada por varios aspectos, entre los más importantes la falta de rotación de pesticidas en los cultivos y el uso inadecuado de los mismos. La resistencia a fungicidas fue descrita por primera vez en 1960, en *Penicillium* spp., causante de la pudrición de frutos cítricos almacenados, resistente a los hidrocarburos aromáticos. En muchas ocasiones la aparición del primer caso de resistencia se presenta casi dos años después de la introducción del pesticida en el mercado agrícola, lo que obligaba a los agricultores a la aplicación de mas producto, aun sabiendo que no es lo suficientemente efectivo (Keith & Derek, 2007). Más recientemente se han desarrollado otros fungicidas como las benzilaminas que generan menos resistencia, pero con efectos adversos que generan graves problemas de salud y a pesar de esto, siguen siendo utilizados al no haber más productos activos disponibles (Keith & Derek, 2007).

2.3 Generalidades de los péptidos

Los péptidos son pequeñas estructuras constituidas por aminoácidos, unidos entre sí por enlaces covalentes que presentan en sus extremos grupos amino y carboxilo libres, y según la IUPAC su tamaño oscila entre unos pocos aminoácidos hasta 50 residuos. (Wang, 2010). La mayoría de los péptidos son de origen ribosomal, pero también hay péptidos no ribosomales, que son producto de rutas metabólicas simples, que por lo general son originados en algunos procariotas y eucariotas inferiores como algas, esponjas y hongos. Ambos grupos por lo general cumplen muchas funciones biológicas tales como estructurales, inmunológicas, hormonales, de defensa, entre otros. Adicionalmente se han desarrollado péptidos de origen sintético, que por lo general suelen ser cortos, cíclicos y con residuos modificados (como D- aminoácidos o aminoácidos no naturales).

Los aminoácidos estructuralmente están conformados por un carbono α al que están unidos un grupo carboxilo (de matriz ácida), un grupo amino (de matriz básica), un átomo de hidrogeno y una cadena lateral que diferencia a cada aminoácido de los demás por su alta diversidad. Por poseer un carbono α , los aminoácidos poseen una imagen especular y por ende un isómero óptico, es así como los aminoácidos pueden ser L o D dependiendo de la disposición espacial de los cuatro constituyentes. La mayoría de los aminoácidos que conforman las proteínas y péptidos naturales son L.

Los aminoácidos están divididos principalmente en dos grupos, no polares y polares, basados en las características fisicoquímicas de sus cadenas laterales que les confieren diferentes propiedades bioquímicas. Los primeros se subdividen en alifáticos (glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina y metionina) y aromáticos (fenilalanina, tirosina, triptófano). Los aminoácidos polares se dividen en neutros (serina, treonina, cisteína, asparagina, glutamina) y cargados, estos a su vez pueden ser ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico) o básicos (lisina, asparagina e histidina).

2.3.1 Generalidades de las estructuras de los péptidos.

Los péptidos pueden adquirir varias conformaciones que también dependen de su secuencia, las dos disposiciones más frecuentes en cuanto a la estructura secundaria son las hélices α y las láminas β , con menor frecuencia pueden estar presente giros o bucles.

2.3.1.1. Hélices α . La mayoría de péptidos y proteínas adquieren esta conformación. Ésta se forma cuando el péptido se enrolla sobre sí mismo mediante puentes de hidrógeno entre el grupo CO del enlace peptídico del primer residuo y el grupo NH del enlace peptídico del cuarto residuo, de esta manera, las hélices α completan una vuelta alrededor de su eje cada 3,6 aminoácidos. Los planos de los enlaces peptídicos quedan alineados paralelamente al eje de la hélice y las cadenas laterales de los residuos quedan expuestas por fuera del cilindro inclinados levemente hacia el extremo amino, como se muestra en la figura 1-A. El esquema de la rueda helicoidal es una representación útil para determinar las posibles interacciones de un péptido con otras moléculas, teniendo en cuenta los residuos que lo conforman (Figura 2). Una hélice α se pueden catalogar hidrófoba si está constituida por residuos apolares, hidrofílica cuando los residuos son polares y anfipática cuando los residuos polares se agrupan en una cara y los apolares en otra.

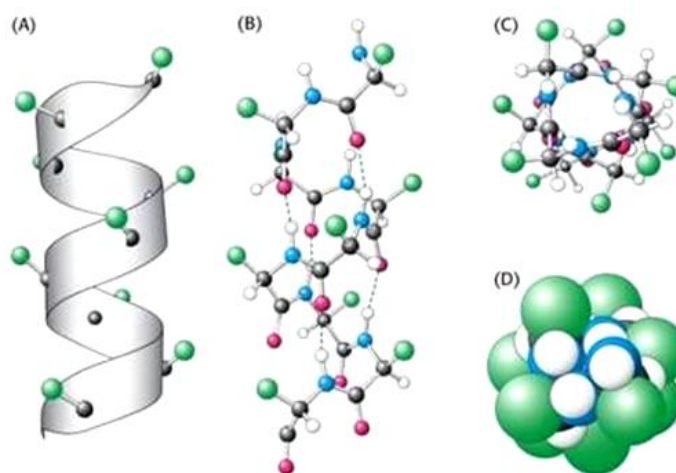


Figura 1. Ejemplo de una hélice α (A) Esquema, donde se observa los radicales expuestos hacia el exterior de la cadena (B) Molecular, donde se evidencia los puentes de hidrógenos que permite la formación de la hélice α (C) vista superior (D) modelo de espacio relleno. Tomada de <http://giantsoulders.wordpress.com/2007/10/23/ramachandran-plots-and-the-alpha-helix/>

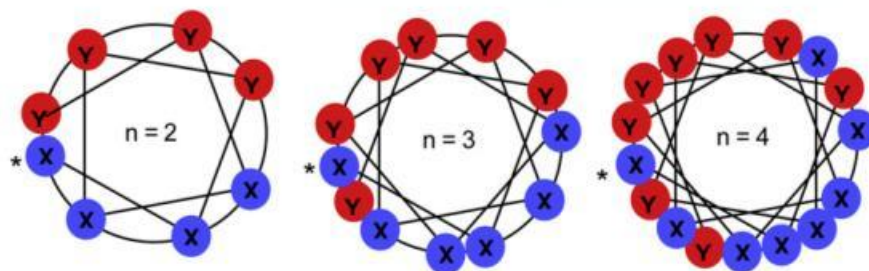


Figura 2. Esquema rueda helicoidal de un péptido que forma hélice α donde se muestra la distribución de los residuos cargados (azules) y los no cargados (rojos). “*” Indica el inicio de la cadena y “n” la cantidad de vueltas (Wiradharma et al., 2011).

2.3.1.2. Láminas β . Comparado con las hélices α , las láminas β son menos frecuentes en la conformación natural de las moléculas proteicas. Las láminas β están conformadas por dos o más hebras β , que se encuentran una junto a la otra y mediante enlaces de hidrógeno entre los grupos CO y NH forman una estructura estable; las hebras se pueden disponer en el mismo sentido de forma paralela o antisenal llamada antiparalela. Las láminas β son más o menos estables, todo depende de los residuos que la conforman y de las interacciones entre las cadenas laterales de las hebras adyacentes (Figura 3).

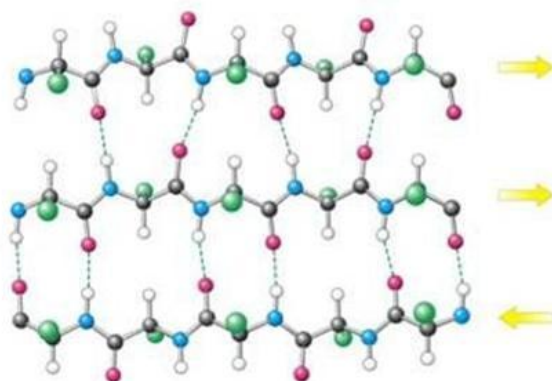


Figura 3. Ejemplo de una lámina beta plegada (las flechas indican la dirección de la cadena aminoacídica) Tomada de <http://giantsshoulders.wordpress.com/2007/10/23/ramachandran-plots-and-the-alpha-helix/>

2.3.1.3. Giros y bucles. Algunas cadenas polipeptídicas adoptan estructuras globulares o estructuras más compactas que le permiten tener una mayor estabilidad, para lograrlo las secuencias deben cambiar de dirección varias ocasiones y volver sobre sí misma hasta conformar la estructura deseada. Las regiones en la que la cadena cambia de dirección se

denominan bucles. En los giros predominan los residuos de glicina ya que los ángulos necesarios que se deben conformar no son posibles para el resto de residuos. Los giros son los principales motivos de interacción con muchas moléculas.

2.4 Péptidos antimicrobianos (PAMs)

Los PAMs hacen parte del sistema inmune de la mayoría de organismos vivos como bacterias, hongos, plantas, insectos y vertebrados, constituyendo en invertebrados la principal defensa en la inmunología innata y para los vertebrados adicionalmente también hace parte importante de la modulación del sistema inmune adaptativo en la defensa ante los patógenos. Los PAMs pueden ser rápidamente sintetizados a bajo costo metabólico, almacenarse en grandes cantidades y estar disponible en el momento de la infección (Zhao, 2003).

Wang (2010) describe en su libro que los PAMs son producidos por diversos organismos, los animales producen cerca del 71.3% de los PAMs conocidos, seguido por las plantas con un 14.2%. Específicamente en el grupo de los animales los anfibios presentan un mayor porcentaje de producción de péptidos antimicrobianos representando un 38.7% del total de péptidos (Figura 4), ya que han sido los organismos más estudiados en la búsqueda de PAMs.

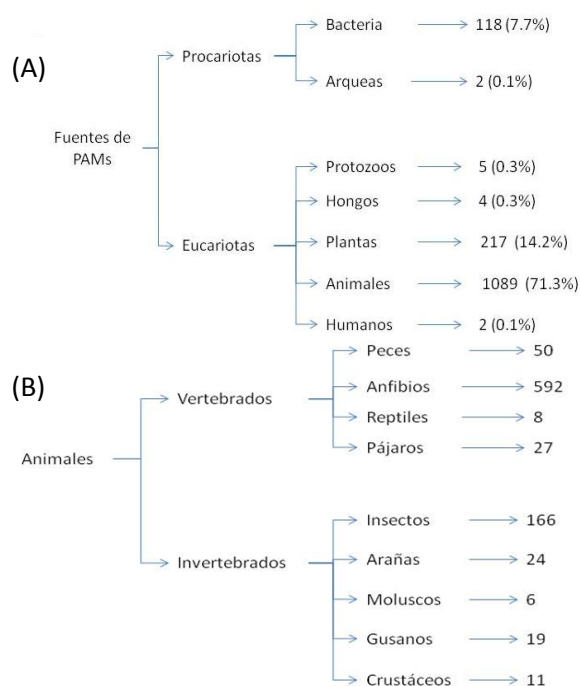


Figura 4. Distribución de los organismos productores de los PAMs. (A) Numero de péptidos antimicrobianos producidos por la variedad de organismos. (B) Numero de PAMs distribuidos en el reino animal. Los datos fueron tomados de Antimicrobial Peptide Database y analizados en Febrero de 2010. (Número total de PAMs analizados, 1528) (Wang, 2010)

Los PAMs se reconocieron como moléculas antimicrobianas solo hasta la década de los 80's, a pesar de que con anterioridad ya se habían descrito algunos péptidos con estas propiedades. Uno de los primeros péptidos evaluados frente a varias cepas bacterianas y con una actividad antimicrobiana importante fueron las maganinas producidas por anfibios (Zasloff, 1987; Gutierrez & Orduz, 2003), de ahí en adelante otros PAMs fueron encontrados y estudiados, entre ellos las cecropinas y las defensinas de insectos y humanos respectivamente, con acción frente a diferentes tipos de bacterias y hongos (Daher et al., 1986; Gudmundsson et al. 1991).

Desde enero de 2009 se han sido caracterizado más de 1330 PAMs naturales y sintéticos con una extensa actividad biológica (Venugopal et al., 2010). Por lo general, contienen menos de 50 aminoácidos, aproximadamente 50% son de naturaleza hidrofóbica y tienen una carga neta positiva que está entre +3 y +9; el resto del porcentaje son anfipáticos, con regiones hidrofílicas e hidrofóbicas muy bien definidas (Venugopal et al., 2010; Li, 2011). Los aminoácidos que componen al péptido, la carga, la solubilidad y el tamaño, son las características que favorecen la interacción con bicapas lipídicas de las membranas citoplasmáticas de patógenos microbianos (Reddy, et. al., 2004; Zelezetsky & Tossi, 2006; Huang, et al., 2010)

2.4.1 Clasificación de los PAMs

Se han publicado numerosas clasificaciones debido a su gran variabilidad, donde se tiene en cuenta el organismo productor, su estructura, función, célula blanco, mecanismos de acción, etc. A continuación se presentan algunas de las clasificaciones más utilizadas.

2.4.1.1. Clasificación según su estructura secundaria o terciaria. Dependiendo de su secuencia aminoacídica, los PAMs, pueden adoptar diferentes estructuras secundarias o terciarias, las más comunes son las hélices α y láminas β como la maganina y las defensinas respectivamente; los demás péptidos pueden adquirir conformaciones cíclicas, globulares o irregulares. En la figura 5 se muestran las principales estructuras (Wimley, 2010).

2.4.1.1.1. Hélices α . La mayoría de los PAMs están dentro de este grupo. Estos péptidos en fase acuosa no adquieren esta conformación, pero cuando entran en contacto con las membranas celulares blanco forman la hélice α para interactuar ya sea, insertándose o dañando la membrana (Wimley, 2010). En este grupo los PAMs más estudiados son las maganinas que son péptidos de 21 a 26 aminoácidos, producidos por una rana africana y tienen actividad frente a microorganismos y células tumorales, con baja actividad hemolítica (Díaz, 2011); otros ejemplos son las cecropinas que fueron encontradas inicialmente en la hemolinfa de insectos, su tamaño oscila entre 3 y 4 kDa, tienen actividad frente a bacterias, no presentan citotoxicidad y son susceptibles a proteasas (Marshall & Arenas, 2003; Díaz, 2011).

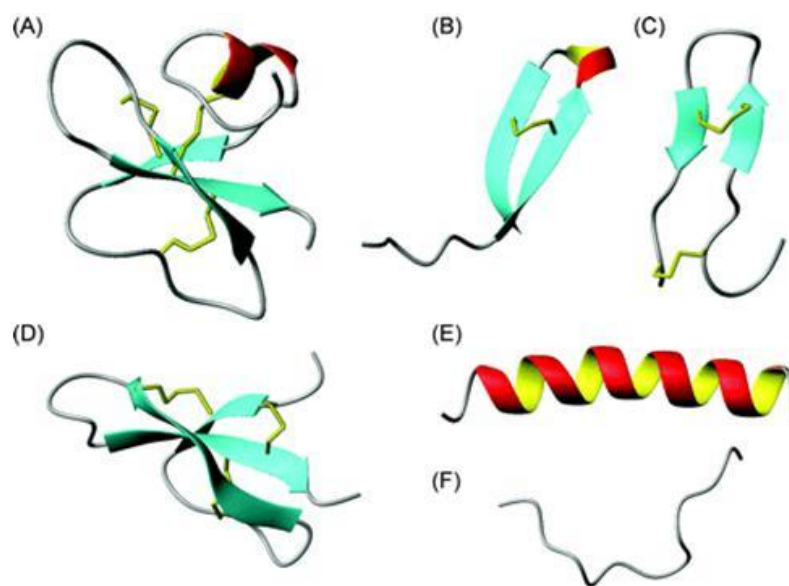


Figura 5. Estructura secundaria de algunos péptidos antimicrobianos (PAMs). (A) Combinación de varias estructuras de β – defensina-2 humana (B), (C) y (D) laminas β de tanatina, polifemusina y defensina- 1 de riñón de ratón respectivamente (E) Helice α de la maganina- 2 y (F) la forma extendida de la indolicidina. Los enlaces disulfuro están en amarillo (Jenssen et al., 2006)

2.4.1.1.2 Laminas β . Regularmente tienen un peso entre 2 y 8 kDa, estos péptidos están conformados por cadenas dispuestas en forma antiparalela unidas uno o varios puentes disulfuro que permiten formar una estructura estable importante en su actividad antimicrobiana. Esta conformación puede presentarse en solución acuosa pero cuando interactúan con los lípidos de la membrana blanco presentan una mejor estabilidad (Yeaman & Yount, 2003). Entre los PAMs que tienen esta conformación más estudiados

son las taquiplesinas y protegrinas, las primeras son catiónicas, de aproximadamente 17 aminoácidos, con dos puentes disulfuro y son producidas por cangrejos herradura; las segundas son sintetizadas por leucocitos de porcinos, poseen dos puentes disulfuro entre cuatro residuos de cisteína y tienen también carga positiva (Marshall & Arenas, 2003).

2.4.1.1.3 Otras conformaciones: En este grupo están los PAMs que están conformados por bucles que por lo general son ricos en prolina y arginina y por ende no forman estructuras anfipáticas. Los lantibióticos por su parte son péptidos pequeños clasificados como bacteriocinas que se forman por modificaciones postraduccionales mediante la formación de enlaces tioester por la deshidratación de residuos como serina y treonina, el más conocido es la nisina que se utiliza para la conservación de alimentos (Zhao, 2003). Otros péptidos que recientemente están siendo bastante estudiados son los que adquieren una conformación cíclica, esta es una estrategia que permite el mejoramiento de la actividad de algunos PAMs, mediante la unión de forma covalente del extremo amida con el extremo carboxi terminal, formando así una estructura más estable que la lineal, brindando resistencia a proteasas, mayor selectividad y especificidad (Marshall & Arenas, 2003).

2.4.1.2. Clasificación según su actividad biológica. Aunque los PAMs están catalogados con actividad antimicrobiana, sus funciones no están limitadas solo en este ámbito y también pueden tener otros espectros de actividad, es así como los podemos catalogar y dividir en péptidos con actividad antibacteriana, antifúngica, antiviral, antitumoral, antiparasitaria, espermicida e insecticida. En la tabla 1 se muestra la distribución de los péptidos según su actividad de acuerdo a la base de datos APD (The Antimicrobial Peptide Database (Wang, 2010)). Para resaltar, algunos PAMs tienen actividad dual, 388 sobre bacterias y hongos, 41 sobre hongos y virus, 40 presentan actividad sobre los tres grupos microbianos y solo diez, adicionalmente tienen actividad antitumoral (Wang, 2010). La especificidad de los PAMs frente a diferentes blancos celulares radica principalmente en las diferencias en la conformación de la membrana de cada tipo de célula. Se han descrito gran cantidad de péptidos que tienen selectividad frente a determinadas células y también PAMs con amplio espectro, que actúan sobre muchos tipos de células (Zhao, 2003).

Tabla 1. Clasificación de los PAMs según APD, teniendo en cuenta su actividad biológica. (Wang, 2010)

Tipo de actividad de los PAMs	Número de péptidos
Antibacteriana	1180
Antifúngica	451
Antiviral	98
Antitumoral	101
Antiparasitaria	16
Espermicida	8
Insecticida	16
Hemolítica	176

2.4.2. Características evolutivas de los PAMs

Desde hace varias décadas se sabe que los PAMs hacen parte fundamental de los sistemas de defensa de muchos organismos, que les permiten combatir a los patógenos, no solo porque tienen capacidad microbicida, sino porque también pueden mejorar la respuesta inmunitaria al intervenir en el proceso de señalización mejorando la respuesta innata de un organismo (Téllez & Castaño, 2010). Estas moléculas han evolucionado para compensar la alta tasa de mutación que presentan los microorganismos patógenos resistentes a los antibióticos convencionales. El éxito de los PAMs radica en su mecanismo de acción, aunque no está bien dilucidado para todos; se conoce que se basa principalmente en la interacción de PAMs con los componentes de la membrana plasmática del microorganismo patógeno, formando canales iónicos y poros que aumentan la permeabilidad y finalmente desencadenan la perturbación de la membrana celular y en estructuras y funciones intracelulares, llevando a autólisis o a apoptosis. La evolución de los PAMs les permite tener diferentes espectros de acción, siendo consecuente con la heterogeneidad de las membranas de las diferentes células blanco (Epand & Vogel, 1999; Hong, et al., 2001; Yeaman & Yount, 2003; Wang, 2010)

En la mayoría de organismos, la inducción de la síntesis de los PAMs está modulada por reguladores de la transcripción. En los vertebrados la producción de los PAMs puede ser de forma constitutiva o inducida en el proceso de inflamación cuando hay presencia de algún

agente extraño para el organismo. En el caso de los humanos, los PAMs son producidos y almacenados en gránulos de células como neutrófilos y macrófagos, estas células tienen mecanismos de control que permiten su degranulación solo cuando tienen estímulos determinados, igualmente se ha descrito que las células de Paneth, que están localizadas en el intestino delgado, secretan gránulos con abundantes defensinas bajo un estímulo bacteriano (Téllez & Castaño, 2010). En anfibios, glándulas ubicadas en la piel secretan abundantes péptidos con amplio espectro de acción con acción antimicrobiana. En los invertebrados los péptidos son producidos rápidamente y de igual forma pueden ser almacenados en células como hemocitos y son liberados a la hemolinfa después del contacto de los patógenos microbianos (Zhao, 2003; Téllez & Castaño, 2010).

2.4.3. Características fisicoquímicas determinantes de la actividad antimicrobiana

Dentro de las características determinantes en la actividad antimicrobiana se incluyen el tamaño, los residuos por los que están compuestos y su organización, la tendencia a formar una estructura secundaria determinada (hélices α o láminas β), la carga, que normalmente es positiva, la hidrofobicidad y la anfipaticidad, entre otros (Zelezetsky & Tossi, 2006). Estas características no son independientes, no basta con que una molécula tenga una sola para tener una excelente actividad, es importante que agrupe varias y en una proporción adecuada para mantener un equilibrio entre alta capacidad antimicrobiana y baja toxicidad, por lo general la atracción de alguno de estos aspectos lleva a efectos adversos (Yeaman & Yount, 2003 ; Takahashi et al., 2010).

2.4.3.1. Carga. La carga es uno de los factores más importantes e influyentes en la actividad antimicrobiana de los PAMs, considerando que las principales hipótesis que describen que el modo de acción de los PAMs, se basa principalmente en la interacción electrostática del péptido con la membrana blanco por atracción de cargas, ya que las membranas microbianas, especialmente las bacterianas, son de carga negativa debido a los fosfolípidos que las componen, esta unión genera finalmente un daño en la membrana lo que la lleva a la muerte. La mayoría de PAMs activos tienen una carga positiva que oscila entre +2 y +9, aunque se ha reportado que el rango ideal está entre +4 y +6, ya que una

carga más alta podría alterar de forma negativa la actividad antimicrobiana aumentando la hemólisis, y alterando la anfipaticidad y la hidrofobicidad (Takahashi et al., 2010). Adicionalmente, la carga le confiere a los PAMs selectividad sobre las células blanco, porque aunque para la mayoría de células las membranas están cargadas negativamente, las membranas bacterianas poseen son más aniónicas que las fúngicas o animales, porque estas últimas además de los fosfolípidos contienen ergosterol y colesterol respectivamente, componentes que neutralizan la carga neta haciendo que no sea tan negativa. En gran cantidad de estudios se ha comprobado que existe una fuerte relación entre la cationicidad y la actividad antimicrobiana; sin embargo, esta relación no siempre es directa o lineal, depende del péptido y del organismo blanco y casi siempre es proporcional el aumento de la carga con el aumento de la potencia antimicrobial (Yeaman & Yount, 2003).

2.4.3.2. Anfipaticidad. La diferencia de las regiones polares y no polares es trascendental en la actividad y en la citotoxicidad de los PAMs. Después que el péptido se une a la membrana, la región hidrófoba le permite insertarse y estabilizarse en la bicapa lipídica al interactuar con las cadenas acilo de los fosfolípidos, que también son de matriz hidrófoba. La anfipaticidad es un parámetro delicado ya que un aumento puede incrementar la citotoxicidad y la disminución drástica de la eficacia microbicida, aun así, no es un criterio que pueda ser ajustado de forma individual sin tener en cuenta los demás parámetros (Takahashi et al., 2010; Zelezetsky & Tossi, 2006).

2.4.3.3. Hidrofobicidad. En conjunto con la anfipaticidad y la carga, la hidrofobicidad es un factor que permite definir el espectro de actividad y selectividad antimicrobiana de los PAMs, ya que la porción hidrófoba del péptido es la que tendrá contacto con la capa lipídica. La hidrofobicidad está definida como el porcentaje de residuos hidrófobos que componen el péptido, normalmente es alrededor de 50%. Está claro que la hidrofobicidad tiene una relación inversamente proporcional con la selectividad, debido a que hay un favorecimiento de la interacción de los PAMs con los fosfolípidos de las membranas, de tal forma que un péptido altamente hidrofóbico causa daño en todo tipo de membranas celulares tanto procariotas como eucariotas, es por esto que un péptido altamente hidrófobo habitualmente es altamente hemolítico. En pruebas con

membranas artificiales se evaluaron péptidos muy hidrofóbicos comparados con péptidos con un nivel de hidrofobicidad normal y se obtuvo que los primeros permeabilizaron entre 60 y 300 veces más que los péptidos con una hidrofobicidad media o normal (Yeaman & Yount, 2003).

2.4.3.4. Tendencia estructural. Las estructuras secundarias como las hélices α están desarticuladas en solución acuosa, pero en cuanto tienen contacto con la membrana plasmática adquieren su conformación. La tendencia de un péptido para adoptar la conformación de hélices α , juega un papel importante en la selectividad, pues idealmente se busca que los PAMs tengan cierta elasticidad, que en muchos casos es otorgada por una glicina en el centro de la molécula y que actúa como bisagra, logrando un mejor acoplamiento del péptido en el momento de la interacción.

2.4.4. PAMs sintéticos y péptidos miméticos

2.4.4.1. Péptidos sintéticos. A partir de los péptidos naturales a los cuales se les conoce la secuencia aminoacídica y sus perfiles de actividad, se han desarrollado numerosas variantes, que son denominadas como un péptido nuevo y diferente al original, que permiten suplir las posibles desventajas que puedan tener los PAMs naturales, también se han diseñado de novo péptidos con base en las propiedades individuales de los aminoácidos con el fin de obtener moléculas más activas (Lee & Lee, 2008; Lee et al., 2011).

El diseño y síntesis de péptidos está dirigido a mejorar las condiciones físico-químicas como el aumento de la carga positiva reduciendo al mínimo la hidrofobicidad, para conseguir que los PAMs puedan ser más activos y menos citotóxicos. Muchos PAMs naturales son candidatos potenciales para ser usados en el tratamiento de diferentes infecciones microbianas, pero debido a su capacidad de lisar eritrocitos humanos no pueden ser utilizados. Hasta el momento, la mayoría de péptidos que han sido desarrollados comercialmente tienen presentación tópica tipo ungüentos para el tratamiento de infecciones superficiales (Matsuzaki, 2009; Wang, 2010; Wiradharma et al., 2011). Otro de

los grandes problemas que se trata de resolver con este tipo de péptidos es la resistencia a tratamieto con estos, que es mínima si la comparamos con la acrecentada resistencia de los microorganismos frente a los antibióticos.

Según Zelezetsky & Tossi (2006) el diseño de péptidos sintéticos se basa principalmente en cuatro enfoques. 1. Modificación de la secuencia originales de PAMs naturales, eliminando, remplazando o adicionando algunos residuos; bloqueando ya sea el extremo amino o carboxi terminal o ensamblando secuencias de diferentes péptidos naturales. 2. Diseño de péptidos de “novo”, teniendo en cuenta los residuos que favorezcan la formación de hélices α , tales como lisina o arginina como residuos básicos y alanina, leucina, isoleucina, fenilalanina o triptófano como residuos neutros para brindar hidrofobicidad a la molécula; con esta estrategia se obtienen PAMs muy potentes, pero se ignora el proceso de evolución natural por lo que se puede presentar alta toxicidad. 3. Utilizando librerías combinatorias tanto de péptidos naturales como de péptidos sintéticos se pueden obtener moléculas con alta actividad. 4. Diseño de péptidos basados en secuencias de amplias colecciones de péptidos naturales que señalen la distribución de diferentes residuos que influyan en la variación de las condiciones fisicoquímicas y que pueden ser correlacionadas con la especificidad y la potencia; esta estrategia es muy útil ya que tiene en cuenta la evolución y disminuye la cantidad de péptidos que se deben sintetizar para ser evaluados.

2.4.4.2. Péptidos miméticos. Los péptidos miméticos son péptidos sintéticos que imitan la actividad de los PAMs, que son diseñados con modificaciones estructurales que tratan de solucionar las falencias de los péptidos naturales y los péptidos sintéticos, como evitar la hidrólisis por proteasas y la disminución de la hidrofobicidad. Entre las modificaciones más comunes se incluyen la inserción de D- aminoácidos, residuos fluorados o de peptoides, la inclusión de moléculas no proteicas como lípidos y la ciclación (Wiradharma et al., 2011).

2.4.4.3. PAMs con D-aminoácidos. Se ha encontrado que al cambiar algunos aminoácidos que tienen conformación L por residuos con conformación D se disminuye

notablemente la citotoxicidad sobre eritrocitos humanos, esta reducción es proporcional al número de residuos sustituidos; según Matsuzaki (2009), cambiar solo tres residuos a su enantiómero puede eliminar la hemólisis sin alterar su actividad antimicrobiana. Por otro lado, la utilización de D-aminoácidos evita la degradación de los péptidos por proteasas, lo que aumenta su vida media y por ende su actividad.

2.4.4.4. PAMs con residuos peptoides. Los peptoides son polímeros de residuos de glicina sustituidos, que contienen centros torcidos en la posición α de sus cadenas laterales, estos oligómeros carecen de donantes de enlaces de hidrógeno, lo que impide la formación de los enlaces de hidrógeno entre cadenas usuales, pero pudiendo formar hélices por el impulso de la influencia estérica de las cadenas torcidas laterales. Se ha demostrado que la inclusión de peptoides de aminoácidos como la glicina mejora el índice terapéutico de péptidos y disminuye la hemólisis y la citotoxicidad (Matsuzaki, 2009). Con esta modificación hay pérdida de la estructura secundaria debido a que no se pueden dar los puentes de hidrógeno necesarios y adicionalmente puede haber cambio en el modo de acción (Matsuzaki, 2009; Chatterjee, et al., 2012).

2.4.4.5. PAMs cíclicos. La ciclación de péptidos lineales mediante enlaces disulfuro puede aumentar la selectividad tóxica, disminuyendo la hemólisis, sin afectar la estructura helicoidal ni su carga. En algunos casos se incluyen adicionalmente D aminoácidos, lo que permite mejorar aun más la actividad y eliminar totalmente la citotoxicidad. Otra de las ventajas es la estabilidad *in vivo* de los péptidos (Som, et al., 2008; Wiradharma et al., 2011; Chatterjee et al., 2012).

2.4.4.6. PAMs con polietilenglicol. La unión de polietilenglicol (PEG) al péptido es muy utilizada para probar *in vivo* su actividad para ser desarrollados como fármacos. Guiotto et al. (2003) trabajaron con la PEGilación de la nisina y aunque se obtuvo que la actividad se redujo dos veces, se pudo mejorar sustancialmente la solubilidad de la molécula, la actividad hemolítica también fue disminuida y no hubo cambio en su modo de acción.

2.5 Mecanismo de acción de los PAMs

Aunque se ha investigado el mecanismo de acción de los péptidos sobre los diferentes tipos de células blanco, en realidad no se conoce con precisión como es el mecanismo o modo de acción. Se ha encontrado que los PAMs no solo actúan sobre la membrana plasmática, sino que también interactúan con otros blancos intracelulares de los microorganismos patógenos, en donde impiden la formación del septo de la membrana citoplasmática, inhiben la síntesis de la pared celular, la de ácidos nucleicos y la de proteínas; así como algunas actividades enzimáticas (Ganz, 2003; Brogden, 2005).

Es por esto que algunos autores han clasificado los PAMs en dos grupos globales, los que necesitan receptor y los que no lo necesitan, pero en ambos casos es innegable la importancia de la interacción del péptido con la membrana (Jenssen et al., 2006; Teixeira et al. 2012). Se han descrito diferentes formas mediante las cuales se logra la disrupción de la membrana, de todas maneras está claro que independientemente del mecanismo de acción, el nivel actividad depende de la concentración del PAM (Venugopal et al., 2010).

2.5.1 Mecanismo mediado por receptor

La mayoría de los péptidos de este tipo son producidos por bacterias y contienen dos regiones bien definidas, la primera se une al receptor y la otra tiene la capacidad de formar el poro. Este mecanismo está postulado para péptidos que son activos a concentraciones muy bajas (nanomolares) como la nisina, utilizada ampliamente en la industria alimentaria. Éste péptido se une al lípido II de las membranas bacterianas, que participa en la síntesis del peptidoglicano, por lo que la nisina es más activa sobre bacterias Gram positivas, debido a que poseen mayor cantidad de peptidoglicano (Yeaman, 2003; Díaz, 2011).

2.5.2 Mecanismo no mediado por receptor

Los PAMs que tienen este mecanismo no poseen una molécula específica con la que deben unirse para ejercer su acción, casi todos los péptidos descritos hasta el momento tienen este mecanismo, sobre todo los membranolíticos (Díaz, 2011).

2.5.3 Características de las membranas blanco importantes en la selectividad

Las membranas celulares están conformadas básicamente por una bicapa de fosfolípidos fusionados con proteínas, cuya función es el control del flujo de entrada y salida de metabolitos, actuando como una barrera que protege el espacio intracelular de reacciones químicas; la fluidez de la membrana está definida por la estructura físico química de los lípidos que la conforman. La selectividad de los PAMs en cuanto a la eficacia de su actividad sobre las membranas procariotas y eucariotas se debe finalmente a las diferencias conformacionales entre ambos grupos. Los componentes lipídicos de las membranas son determinantes en la actividad de los péptidos, ya que de su estructura depende que se originen las interacciones electrostáticas necesarias para los PAMs puedan desarrollar su acción (Teixeira et al., 2012). Cada grupo celular tiene una abundancia relativa de ciertos lípidos, luego las membranas bacterianas poseen mayor cantidad de lípidos cargados negativamente como cardiolipina y fosfatidilglicerol. En contraste, las células eucariotas, tanto fúngicas como humanas presentan mayor cantidad de lípidos neutros como el ergosterol y colesterol respectivamente, lo que hace que la membrana no tengan una carga tan negativa y tenga una mayor estabilidad (Yeaman & Yount, 2003) (Figura 6). Otros factores importantes a tener en cuenta y que pueden influir notoriamente en la selectividad incluyen, la distribución de los lípidos y los demás componentes de las membranas como lipopolisacaridos, peptidoglicanos, etc., el potencial transmembranal y la polaridad. Pero es importante anotar que todas estas deducciones se han obtenido con base en ensayos *in vitro*, lo que podría no ser reflejo fiel de lo que ocurre *in vivo*.

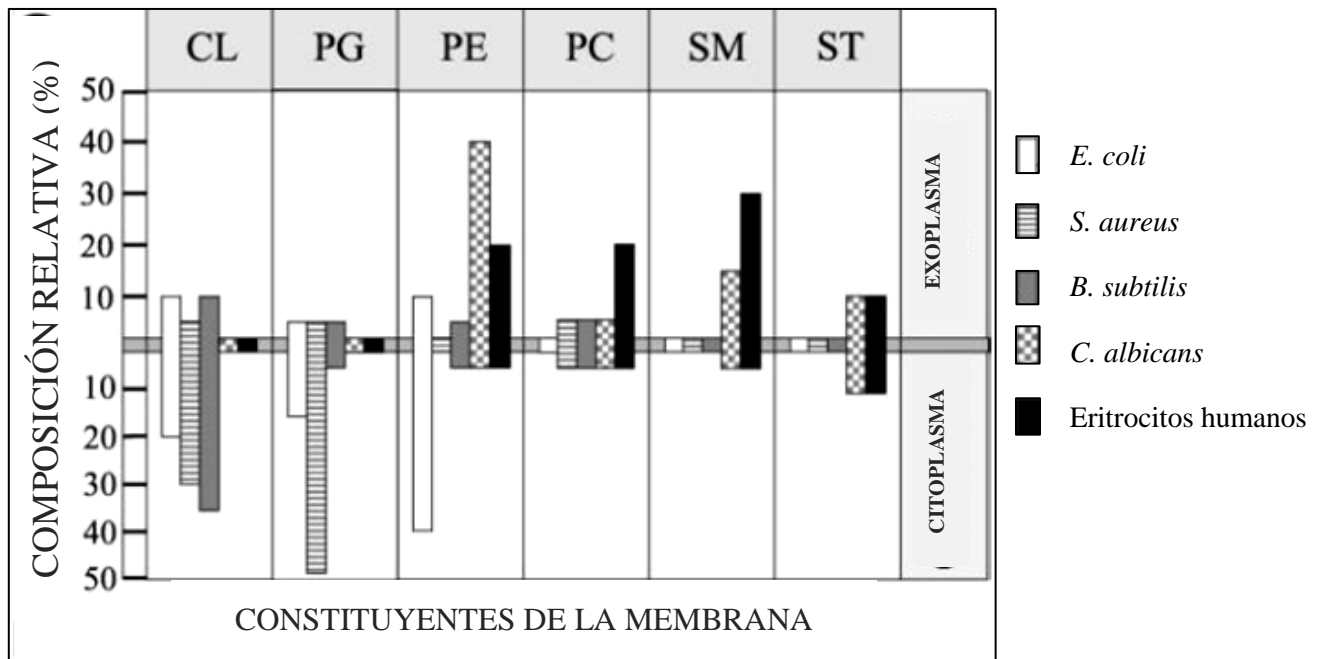


Figura 6. Constituyentes lipídicos de membranas procariotas y eucariotas. De los mas aniónicos, pasando por lípidos bipolares hasta los menos cargados o neutros; CL: Cardiolipina, PG: Fosfatidilglicerol, PE: Fosfatidiletanolamina, PC: Fosfatidilcolina, SM: Espingomielina y ST: Colesterol (para eritrocitos) o Ergosterol (para hongos). Tomada de Yeaman & Yount, (2003)

Igualmente las diferencias entre bacterias también son importantes por ejemplo las bacterias Gram positivas poseen una membrana conformada por una bicapa de fosfolípidos que un 57% son del tipo fosfatilglicerol, 38% por lisilfosfatilglicerol y el resto del porcentaje cardiolipina, esta membrana está unida a una capa gruesa de peptidoglicano porosa por ácidos lipoteicoicos (Teixeira et al., 2012), por otro lado la membrana de las bacterias Gram negativas es más compleja, ya que poseen dos membranas que están conformados en un 74 % por fosfatidiletanolamina, 19% fosfatidilglicerol y un 3% por cardiolipina; entre las dos membranas poseen una capa delgada de peptidoglicano que se une a la capa mas externa por lipoproteínas, adicionalmente poseen proteínas y porinas en la membrana mas externa (Figura 7) (Yeaman & Yount, 2003; Venugopal et al., 2010; Teixeira et al., 2012). Adicionalmente se ha comprobado que las bacterias con niveles más altos de lípidos cargados negativamente son más susceptibles a PAMs, como *Staphylococcus epidermidis* que su membrana está conformada en su 90 % de fosfatidilglicerol y es más susceptible a la acción de magainina (Matsuzaki, 2009)

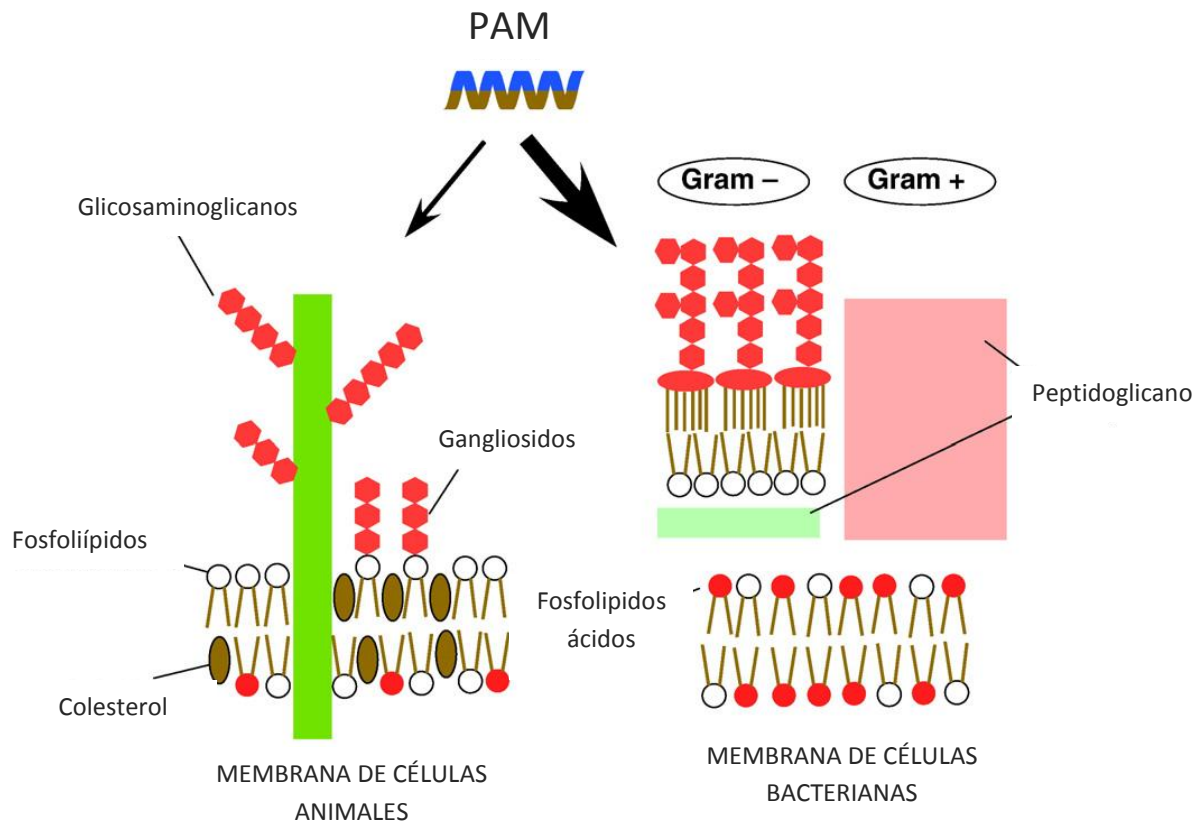


Figura 7. Esquema de los componentes de las membranas animales y bacterianas, tanto para Gram negativas como para Gram positivas; adicionalmente se muestra un PAM que forma hélice α y las flechas muestra la mayor actividad hacia las bacterias (flecha más gruesa) y menor actividad sobre células animales (flecha delgada) (Matsuzaki, 2009).

2.5.4 Modelos propuestos de los modos de acción de los PAMs

En la literatura hay descritos diferentes modelos que ayudan a explicar el mecanismo de acción de los PAMs sobre los diferentes microorganismos blanco. En cuanto a la actividad antibacteriana se conoce que está sujeta a la interacción de los fosfolípidos aniónicos de la membrana bacteriana con los PAMs catiónicos, específicamente las regiones polares del péptido con las cadenas polares de los fosfolípidos, lográndose la inserción del péptido en la membrana microbiana. Después pueden ser interiorizados al citoplasma si hay baja concentración de péptido o gracias a su flexibilidad pueden orientarse perpendicularmente a la membrana, formando poros transmembranales (Gutierrez & Orduz, 2003).

Para explicar los mecanismos de permeabilización de la membrana mediada por los PAMs se han propuesto diversos modelos, cada uno de estos podrían llevar a tres eventos. 1) La formación de canales instantáneos, 2) Micelación o disolución de la membrana y 3) Translocación a través de la membrana (Figura 8).

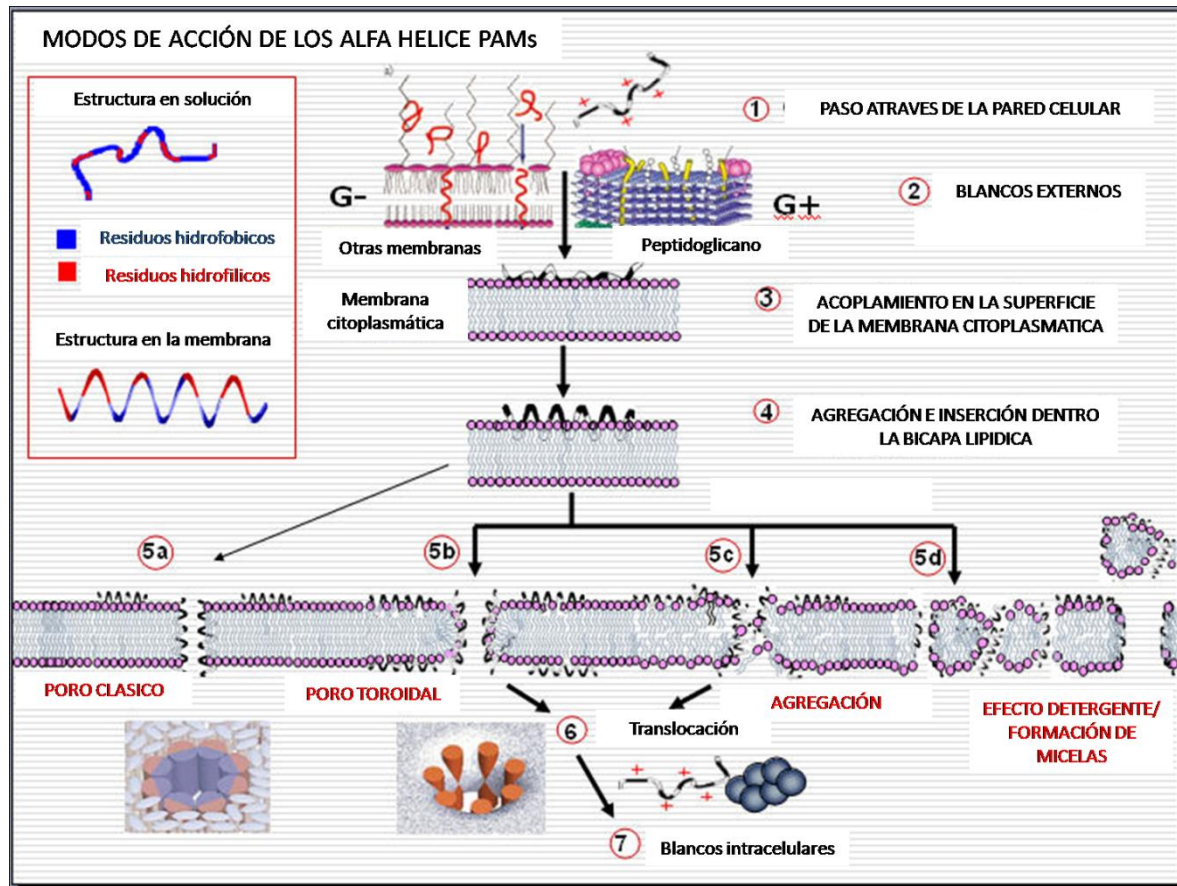


Figura 8. Mecanismos propuestos para la actividad de los péptidos antimicrobianos. Tomada de <http://www.bbcm.units.it/~antimic/researchAlfa-HelicalPeptides.html>

Dentro de los modelos de acción se reconocen cuatro como los más estudiados. 1) Modelo de alfombra en el que los PAMs se aglomeran en la membrana orientados de forma paralela al ser atraídos por la carga opuesta, luego actúan como detergentes rompiendo la membrana por la formación de micelas (Wimley, 2010). 2) Modelo de tapón de barril en el que los PAMs se ubican en la membrana formando un orificio con espacio central, este mecanismo se presenta principalmente en los péptidos helicoidales donde las regiones hidrofóbicas se alinean con la región lipídica y la porción hidrofílica forma la región interior del poro

(Hancock, 1997; Wimley, 2010). 3) Modelo del poro toroidal en el que los PAMs con estructura alfa hélice se unen a la membrana, se agregan e inducen a la monocapa de lípidos a plegarse sobre sí misma de forma continua, estabilizando la formación del poro por las interacciones hidrofóbicas entre las regiones apolares del péptido que envuelven a las cabezas de los lípidos de la membrana, alcanzando a interactuar simultáneamente con las cadenas acilo de los lípidos (Hancock, 1997; Spaar et al., 2004; Wimley, 2010). 4) Modelo de agregación, donde los péptidos se disponen en el espacio de la membrana en forma de agregados, con complejos de péptidos y lípidos parecidos a una micela, pero no adoptan una orientación en particular (Zhao, 2003).

Además de la actividad de estas moléculas contra bacterias, se ha observado que los péptidos tienen actividad contra otras células de tipo eucariota como las fúngicas. Los péptidos fungicidas presentan una alta variedad conformacional, lo que demuestra que no hay dominios estructurales conservados que se puedan relacionar con la actividad sobre células fúngicas. Esta actividad antifúngica está descrita principalmente para PAMs del tipo defensinas producidos por plantas que son ricos en aminoácidos polares y aminoácidos neutros (Di Marino et al., 2012). El mecanismo de acción de algunos péptidos antifúngicos continúa siendo un tema de discusión, pero se conoce que la formación de especies reactivas de oxígeno es el paso decisivo en la actividad biocida de numerosos PAMs (Maurya et al., 2011; Lee et al., 2003). Se ha demostrado que el péptido catiónico histatina-5 causa una disminución en la actividad mitocondrial en *C. albicans*, este fenómeno es similar al que se presenta en bacterias (Maurya et al., 2011). Igualmente se ha demostrado que para otros péptidos la acción antifúngica se explica por la disminución de potasio, que altera la concentración de iones y por ende el metabolismo celular (Kim, Lee, Kim, & Lee, 2001)

Así mismo se conocen numerosos péptidos con actividad antiparasitaria y antiviral, los estudios realizados relacionando actividad con estructura indican que la actividad antiprotozoaria y antiviral es mediada por diferentes mecanismos y que estas propiedades son dependiente posiblemente de motivos peptídicos diferentes a los requeridos para bacterias y hongos. Dentro los PAMs más activos contra parásitos se ha descrito la

magainina 2 que produce la lisis de células de protozoos, la catelicidina porcina PMAP-23 tiene actividad contra huevos y adultos de *Caenorhabditis elegans* (Zanetti, 2004). Igualmente se han encontrado péptidos con actividad sobre parásitos tisulares como *Trypanosoma* y *Leishmania* (Alberola et al., 2004). Referente la actividad antiviral, se ha determinado que el mecanismo de acción se basa en impedir la entrada del virus, imposibilitando su unión a la célula blanco por bloqueo del heparan sulfato, molécula indispensable para este suceso. Otro mecanismo es la interacción con la envoltura viral, se sabe que los PAMs tienen la capacidad de interactuar con las envolturas lipídicas, dando como resultado su desestabilización, la formación de poros y lisis (Cole et al., 2002)

2.6. Bases de datos de PAMs

En la actualidad existen numerosas bases de datos de péptidos antimicrobianos de diferente origen, que incluye, péptidos antimicrobianos en general (Whitmore & Wallace, 2004; Fjell et al. 2007; Seebah et al., 2007; Wang et al. 2009; Thomas et al., 2010; Hammami et al., 2010), secuencias de proteínas cíclicas (Wang et al., 2008), de péptidos antimicrobianos de camarones (Gueguen et al., 2006), de péptidos antimicrobianos derivados de plantas (Hammami et al. 2009).

Igualmente se encuentran bases de datos sobre péptidos antimicrobianos recombinantes (Li & Chen, 2008) y finalmente, de péptidos antimicrobianos sintéticos (Wade & Englund, 2002).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antimicrobiana de 21 péptidos sintéticos sobre bacterias, levaduras y mohos filamentosos

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar la actividad antimicrobiana de 21 péptidos sintéticos sobre bacterias de importancia en clínica y en agricultura, adicionalmente establecer la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de los péptidos que presentaron mayor actividad.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de 21 péptidos sintéticos sobre hongos de importancia en clínica y en agricultura, adicionalmente establecer la CIM de los péptidos que presentaron mayor actividad.
- Determinar cualitativamente mediante microscopía de fluorescencia y cuantitativamente (determinación de unidades de fluorescencia), el daño producido por los péptidos a las membranas de las células bacterianas y fúngicas.
- Evaluar la actividad hemolítica de los péptidos con mayor actividad antimicrobiana sobre eritrocitos humanos.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 Péptidos utilizados

Se evaluaron 21 péptidos sintéticos (sintetizados químicamente) diseñados por investigadores participantes en el proyecto, de los cuales 19 son variaciones del péptido BTM- P1 que fue diseñado con base a la toxina insecticida Cry11Bb de *B. thuringiensis* serovar *medellín* (Orduz et al., 1998). De este péptido se conoce que tiene actividad antimicrobiana y la habilidad para permeabilizar mitocondrias (Arias et al., 2009; Lemeshko, 2011). Por otro lado, el péptido A fue diseñado teniendo en cuenta las características fisicoquímicas de los residuos que lo compone y la Dermaseptina (DERMA) es un péptido producido naturalmente por la rana *Phyllomedusa sauvagei* nativa de Sur América.

Para las evaluaciones antimicrobianas, los péptidos fueron diluidos en agua destilada estéril. En la tabla 2 se muestran los péptidos con su código, peso molecular, carga y número de residuos. Algunos de los péptidos tienen sus dos enantiomeros, tanto en conformación L como en conformación D, es así como el péptido P1 está conformado por L aminoácidos y P1D por residuos D, lo mismo ocurre con P26 y P26D; P26CL y P26CD; P1CL y P1CD respectivamente.

Tabla 2. Código, longitud, carga y peso molecular de los péptidos evaluados.

PEPTIDO	SECUENCIA*	PESO MOL (Da)	# a.a	Carga neta pH 7
P26	INFORMACIÓN CONFIDENCIAL	3438,28	33	+5
P26D	INFORMACIÓN CONFIDENCIAL	3438,21	23	+5
P26CL	INFORMACIÓN CONFIDENCIAL	2706,33	26	+3
P26CD	INFORMACIÓN CONFIDENCIAL	2706,33	26	+3
P1CL	INFORMACIÓN CONFIDENCIAL	2192,65	20	+4
P1CD	INFORMACIÓN CONFIDENCIAL	2192,65	20	+4
P1	-----VAPIAKYLATALAKWALKQGFAKLKS-	2788,44	26	+5
P1D	-----v a p i a k y l a t a l a k w a l k q g f a k l k s-	2788,44	26	+5
P13	MENNSFNVLANNNMSSFPLFNSKIEPSIAPALIAVAPIAKYLATALAKWALKQGFAKLKS-	6466,67	60	+4
PL14	-----LFNSKIEPSIAPALIAVAPIAKYLATALAKWALKQGFAKLKS-	4454,45	42	+5
P14	-----IEPSIAPALIAVAPIAKYLATALAKWALKQGFAKLKS-	3864,75	37	+4
P1W	-----VAPIAKYLATALAKWALKQGFAKLKSW	2974,66	27	+5
WP1	-----WVAPIAKYLATALAKWALKQGFAKLKS-	2974,66	27	+5
WP1W	-----WVAPIAKYLATALAKWALKQGFAKLKSW	3160,87	28	+5
P1X	-----ALKLAKVAPIAKYLATALAKLKS-----	2376,99	23	+5
P1B	-----LATALAKWALKQGF-----	1517,83	14	+2
R_P1	-----SKLKAFGQKLAWKALATALYKAIPAV-	2788,44	26	+5
R_P1W	-----WSKLKAFGQKLAWKALATALYKAIPAV-	2974,66	27	+5
R_WP1	-----SKLKAFGQKLAWKALATALYKAIPAVW	2974,66	27	+5
A	ANARKIANARKIA	1467,67	13	+4
DERMA	ALWKTMLKKLGTMLHAGKAALGAAADTISQGTQ	3455,11	34	+3

*Las secuencias en mayúscula son los L- enantiomeros y en minúscula son los D-enantiomeros. Las secuencias en cursiva son los péptidos que están en el sentido contrario al péptido base P1 y está representados por “R_” antes del código del péptido correspondiente.

4.2 Ensayos de actividad antimicrobiana

4.2.1 Actividad antibacteriana y Concentración Inhibitoria Mínima (CIM): Para evaluar la actividad antibacteriana de los péptidos se utilizaron bacterias Gram positivas y Gram negativas, patógenos humanos y fitopatógenas como *Enterococcus faecalis* resistente a Vancomicina (VR) (ATCC 51299), *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina (MR) (ATCC 33591), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y un aislamiento de *Ralstonia solanacearum*. Para los ensayos se sembraron las bacterias en caldo Tripticasa de Soya al 1% (TSB), durante toda la noche con agitación a las temperaturas indicadas (37°C y 30°C). Al día siguiente cada cultivo se ajustó a una densidad óptica (D.O.) a 600 nm entre 0.75 y 0.8 que corresponde aproximadamente a 1×10^8 UFC/ml, luego cada cultivo se diluyó hasta 1×10^3 ó 1×10^5 UFC/ml. De cada inóculo se dispensaron 125 µl en pozos de platos estériles de 96 pozos, adicionalmente se agregaron 50 µl de cada péptido a una concentración final de 5 µM. Los platos se incubaron a la temperatura indicada (30 ó 37°C dependiendo de la cepa bacteriana) durante tres horas. Pasado este tiempo a cada pozo se le agregaron 120 µl de TSB al 3% y nuevamente se incubaron los platos en las mismas condiciones por 12 horas más (Rathinakumar et al., 2009). Para cada péptido se montaron cuatro repeticiones. En cada ensayo se incluyeron controles de crecimiento y de contaminación. La lectura se realizó en un lector de ELISA a 600 nm determinando las unidades de absorbancia, los valores obtenidos fueron comparados con el control de crecimiento (células bacterianas sin tratamiento) para establecer si hubo o no actividad del péptido evaluado.

A los péptidos con mayor actividad se les determinó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) siguiendo la metodología ya enunciada, evaluando cinco diluciones seriadas de cada péptido (0.3 µM, 0.6 µM, 1.2 µM, 2.5 µM y 5 µM). La CIM se determinó como la menor concentración del péptido a la que hay una mortalidad del 100% de las bacterias. Para el ensayo se realizaron cuatro repeticiones en dos ensayos independientes.

4.2.2 Actividad antifúngica y CIM. Para esta evaluación se utilizó un aislamiento de *C. albicans* de origen clínico y una cepa de *Fusarium oxysporum* (ATCC 15648). Para *C.*

albicans se siguió la misma metodología enunciada para bacterias exceptuando por el medio de cultivo, caldo Sabouraud al 1 y 3% según sea el caso (Rathinakumar et al., 2009).

Los ensayos con *F. oxysporum* fueron realizados de la siguiente forma, se sembró el hongo en Agar Papa Dextrosa (PDA) y se incubó a temperatura ambiente por 8 días hasta obtener un cultivo esporulado. Para obtener la suspensión de conidias, se adicionaron 3 ml de agua destilada estéril o PBS estéril sobre el cultivo y con la ayuda de una hoja de bisturí se realizó un raspado de todo el micelio y se recuperó en un tubo falcón plástico estéril con perlas de vidrio estériles con la ayuda de una pipeta, la suspensión se agitó por varios minutos con vortex para facilitar la liberación de las conidias. Posteriormente la suspensión se pasó por un filtro de 0.75 μm para tratar de retener las hifas y obtener solamente una suspensión de conidias. Mediante conteo en cámara de Neubauer se determinó la concentración de conidias y se ajustó a una concentración de 1×10^4 conidias por mililitro. Con este inóculo se realizó el ensayo de CIM, siguiendo el mismo protocolo enunciado para bacterias y levaduras, utilizando como medio de cultivo Caldo Sabouraud al 1 y 3% (Arenas et al., 2009).

Tanto en *C. albicans* como en *F. oxysporum* se evaluaron inicialmente todos los péptidos una concentración final de 5 μM . A los péptidos que presentaron mayor actividad se les determinó la CIM con cinco concentraciones (0.3 μM , 0.6 μM , 1.2 μM , 2.5 μM y 5 μM), cada ensayo tuvo cuatro replicas y se realizaron dos ensayos independientes.

4.3 Actividad hemolítica

Los eritrocitos humanos se lavaron con PBS en tres ocasiones, luego se resuspendieron en un volumen de PBS y 90 μl fueron dispensados en platos de 96 pozos, posteriormente se adicionaron 10 μl de péptido para obtener concentraciones finales de 1, 5 y 15 μM . Para cada concentración se realizaron cuatro repeticiones en dos ensayos independientes. Como control negativo de hemólisis se adicionaron a 10 μl de PBS, como control positivo se trataron los eritrocitos con 10 μl de Tritón X-100 al 0.1%. El plato con las reacciones se incubó durante una hora a 37°C con agitación a 100 rpm. Pasado el tiempo de incubación

las reacciones se centrifugaron a 1000xg por 5 min y a los sobrenadantes se les determinó la hemoglobina liberada midiendo la absorbancia de las muestras a 540 nm (Saido-Sakanaka et al., 2004; Nguyen et al., 2010; Qi et al., 2010). Finalmente se determinó el porcentaje de hemólisis utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Hemólisis} = \frac{(\text{Abs mtras con péptido} - \text{Abs del control negativo})}{(\text{Abs control positivo} - \text{Abs control negativo})}$$

La Concentración Mínima Hemolítica es la concentración a la que los péptidos generaron 5% o más de hemólisis.

4.4 Permeabilidad de las membranas microbianas

Para determinar si los péptidos que presentaron actividad antimicrobiana producen algún daño en las membranas celulares se ejecutaron ensayos de actividad a los que se les adicionó el colorante fluorescente SYTOX® Green. Este colorante tiene la propiedad de unirse a los ácidos nucleicos y producir una fluorescencia verde a la densidad óptica adecuada, pero el colorante solo es interiorizado en las células cuando las membranas plasmáticas están comprometidas o dañadas; es decir, en células intactas no se presentaría emisión de fluorescencia. El daño en las membranas plasmáticas tanto de bacterias, mohos y levaduras se determinó de forma cuantitativa mediante lecturas de fluorescencia en intervalos de tiempo y de forma cualitativa haciendo observaciones microscópicas de las células para comparar la morfología celular con respecto al control, células sin tratamiento con los péptidos antimicrobianos.

Las determinaciones cuantitativas se realizaron siguiendo el método publicado por Bourbon et al., (2008). Brevemente, se realizaron cultivos de toda la noche de los microorganismos (bacterias y levaduras) en los medios correspondientes, posteriormente se diluyeron hasta una absorbancia de 0.6 a 600 nm; luego se centrifugaron los cultivos a 1600xg por 10 min a 4°C y las células fueron lavadas con buffer fosfato estéril (10 mM, pH 7.4) y resuspendidas finalmente en el mismo buffer. Se dispensaron 90 µl de la suspensión en platos de 96 pozos de qPCR y se adicionaron 10 µl de los péptidos a 5 µM, con Sytox® Green (5 µM) en cada

pozo. Las lecturas de las pruebas se realizaron en termociclador para qPCR CFX96-BioRad de la Unidad de Biología Molecular de la Corporación para Investigaciones Biológicas- CIB, los parámetros del programa utilizado fueron los siguientes: filtro de SYBER Green, con 180 ciclos de 1 min a la temperatura indicada para cada microorganismo, con lectura al final de cada ciclo. Finalmente se analizaron las curvas de emisión de fluorescencia y se compararon con los controles negativos (suspensiones celulares no tratadas con péptidos). Para realizar las observaciones microscópicas se tomaron 20 µl de las reacciones a los 0, 60 y 180 minutos, y se observaron en un microscopio con el filtro de excitación verde.

4.5 Análisis estadístico

Se realizarán cuatro replicas en dos experimentos independientes. Los datos se analizaron mediante ANOVA, prueba Tukey y son presentados como la media \pm SEM, considerando las diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1 Actividad antimicrobiana de los péptidos sintéticos

Todos los péptidos fueron evaluados con todos los microorganismos a una concentración final de 5 μM , los péptidos que presentaron actividad se evaluaron en cinco concentraciones para determinar la CIM. No todos los péptidos presentaron actividad con todos los microorganismos. De los 21 péptidos evaluados, 12 mostraron actividad sobre al menos uno de los microorganismos estudiados; en la tabla 3 se muestra la actividad de los péptidos observada con los microorganismos evaluados a una concentración final de 5 μM .

5.2 CIMs para las bacterianas

A los péptidos con actividad antibacteriana se les determinó la CIM, evaluando cinco concentraciones de cada péptido (0,3 μM , 0,6 μM , 1,2 μM , 2,5 μM y 5 μM), en la tabla 3 se muestran la CIM para cada péptido activo. La CIM fue definida como la mínima concentración donde se presentó inhibición de las células bacterianas. Las CIMs oscilan entre 1,2 μM y $> 5 \mu\text{M}$, la mayoría de los péptidos presentaron actividad a la concentración de 5 μM .

5.2.1 CIM de *E. faecalis* VR. En *E. faecalis* VR, solo tuvo actividad el péptido P26D con una CIM de 2,5 μM . En la figura 9 se puede observar el porcentaje de supervivencia de las células bacterianas a las diferentes concentraciones de P26D, donde es claro la disminución de la supervivencia a partir de la concentración 1,2 μM (80%) y que luego se reduce a cero a las concentraciones de 2,5 y 5 μM . Entre las concentraciones 0,3 μM y 0,6 μM de P26D y el control negativo (0 μM) no hay diferencias significativas, a diferencia del resto de tratamientos, donde existen diferencias significativas (Tabla 4).

Tabla 3. CIM en μM de los péptidos sintéticos variantes de P1 sobre las cepas microbianas evaluadas.

CIM (μM)	MICROORGANISMOS					
Péptidos	<i>E. faecalis</i> VR	<i>S. aureus</i> MR	<i>E. coli</i>	<i>R. solanacearum</i>	<i>C. albicans</i>	<i>F. oxysporum</i>
P26	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5	5
P26D	2,5	2,5	2,5	5	> 5	1,2
P26CL	> 5	> 5	5	> 5	5	> 5
P26CD	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5
P1CL	> 5	> 5	> 5	> 5	5	> 5
P1CD	> 5	> 5	> 5	> 5	5	5
P1	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5
P1D	> 5	2,5	5	5	> 5	2,5
P13	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5
PL14	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5
P14	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5
P1W	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5
WP1	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5
WP1W	> 5	5	> 5	> 5	> 5	> 5
P1X	> 5	> 5	> 5	2,5	> 5	5
P1B	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5
R_P1	> 5	> 5	5	> 5	> 5	> 5
R_P1W	> 5	> 5	5	> 5	> 5	> 5
R_WP1	> 5	> 5	2,5	> 5	> 5	> 5
A	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5
DERMA	> 5	> 5	> 5	> 5	5	> 5

Tabla 4. Porcentaje de supervivencia estimada de *E. faecalis* VR, *S. aureus* MR, *E. coli* y *R. solanacearum* tratados con las diferentes concentraciones de los péptidos sintéticos activos, determinado por ANOVA y Tukey.

PÉPTIDOS CONCENTRACIÓN		<i>E. faecalis</i> VR	<i>S. aureus</i> MR	<i>E. coli</i>	<i>R. solanacearum</i>
PROMEDIO ESTIMADO DEL PORCENTAJE DE SUPERVIVENCIA*					
P26D	0,3 µM	111,3 ^A	94,4 ^{AB}	105,0 ^{AB}	127,6 ^{DE}
	0,6 µM	105,8 ^A	91,7 ^{AB}	108,0 ^A	220,8 ^B
	1,2 µM	82,2 ^B	50,8 ^{CD}	107,2 ^{AB}	221,0 ^B
	2,5 µM	-0,8 ^C	1,0 ^E	104,7 ^{AB}	145,8 ^{CD}
	5 µM	-1,9 ^C	0,5 ^E	0,4 ^D	21,1 ^H
P26CL	0,3 µM			102,7 ^{AB}	
	0,6 µM			102,9 ^{AB}	
	1,2 µM			101,5 ^{AB}	
	2,5 µM			90,3 ^C	
	5 µM			4,1 ^D	
P1D	0,3 µM		106,1 ^A	101,6 ^{AB}	97,3 ^{FG}
	0,6 µM		100,2 ^A	102,4 ^{AB}	106,5 ^{EFG}
	1,2 µM		89,8 ^{AB}	105,4 ^{AB}	115,0 ^{DEF}
	2,5 µM		4,1 ^E	104,9 ^{AB}	80,1 ^G
	5 µM		-1,5 ^E	3,6 ^D	4,3 ^H
WP1W	0,3 µM		109,2 ^A		
	0,6 µM		103,2 ^A		
	1,2 µM		87,9 ^{AB}		
	2,5 µM		71,1 ^{BC}		
	5 µM		40,1 ^D		
P1X	0,3 µM				135,8 ^{CD}
	0,6 µM				135,9 ^{CD}
	1,2 µM				169,6 ^C
	2,5 µM				-0,4 ^H
	5 µM				-0,4 ^H
R_P1	0,3 µM			99,5 ^{BC}	
	0,6 µM			102,2 ^{AB}	
	1,2 µM			103,4 ^{AB}	
	2,5 µM			97,6 ^{BC}	
	5 µM			3,1 ^D	
R_P1W	0,3 µM			98,9 ^{BC}	
	0,6 µM			103,7 ^{AB}	
	1,2 µM			102,8 ^{AB}	
	2,5 µM			98,1 ^{BC}	
	5 µM			-1,2 ^D	
R_WP1	0,3 µM			100,4 ^{AB}	
	0,6 µM			101,9 ^{AB}	
	1,2 µM			101,5 ^{AB}	
	2,5 µM			0,8 ^D	
	5 µM			1,7 ^D	
CTROL NEG	0 µM	103,4 ^A	100,0 ^A	100,0 ^B	100,0 ^{EFG}

*Los promedios con la misma letra dentro de cada columna, no son significativamente diferentes (p <0,005)

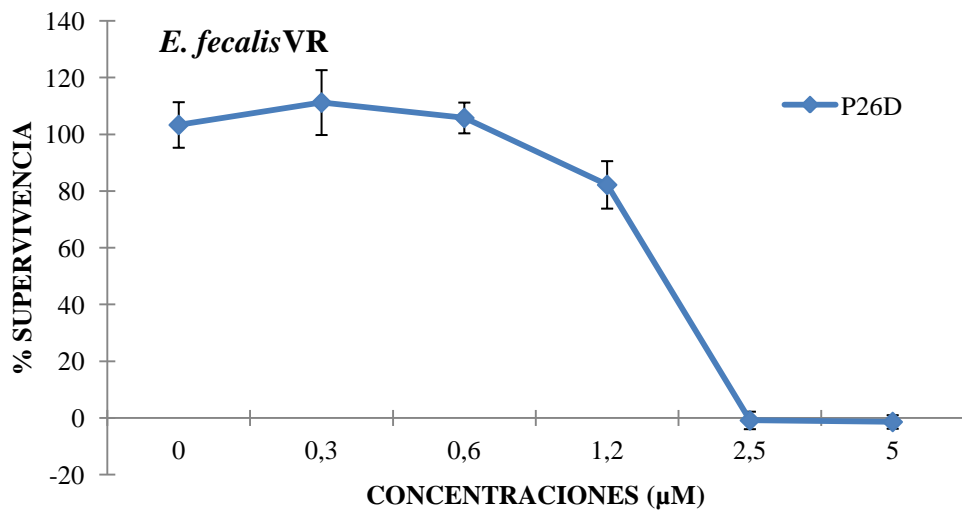


Figura 9. Actividad antibacteriana del péptido P26D en *E. faecalis* VR. La curva mostrada esta en términos del porcentaje de supervivencia de las células bacterianas con \pm DE para las concentraciones evaluadas.

5.2.2 CIM de *S. aureus* MR. *S. aureus* MR fue sensible frente a tres péptidos WP1W, P26D y P1D, los dos últimos tuvieron un comportamiento similar y la CIM para ambos fue de 2,5 μ M y para WP1W fue de 5 μ M (Figura 10), en la tabla 4 se puede ver los grupos según la prueba de Tukey, mostrando las diferencias significativas entre las CIMs y el control negativo.

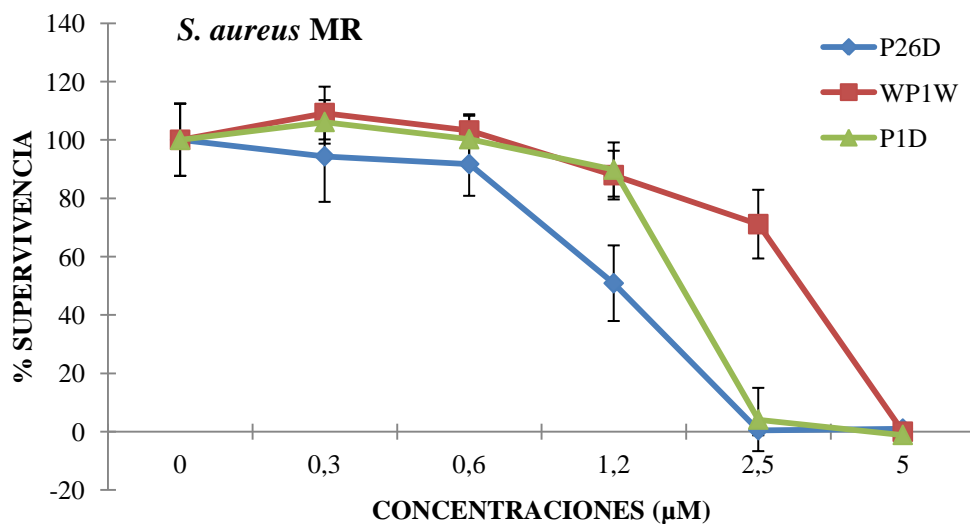


Figura 10. Actividad antibacteriana de los péptido P26D, WP1W y P1D sobre *S. aureus* MR. La curva mostrada esta en términos del porcentaje de supervivencia de las células bacterianas con \pm DE para las concentraciones evaluadas.

5.2.3 CIM de *E. coli*. Los péptidos R_P1, P26CL, R_WP1, R_P1W, P1D y P26D fueron activos frente a *E. coli*, casi todos tuvieron el mismo comportamiento donde la supervivencia se mantuvo estable en 100% y solo cayó drásticamente a 0% a una concentración de 5 μ M. Solamente R_WP1 tuvo un comportamiento diferente donde en la concentración 2,5 μ M no se presentó supervivencia de células bacterianas (Figura 11). Las CIMs de los péptidos activos presentaron diferencias significativas con un valor $p < 0.005$ con las concentraciones restantes y con el control negativo. En la tabla 4 se presenta la distribución de los grupos estadísticos según la prueba de Tukey.

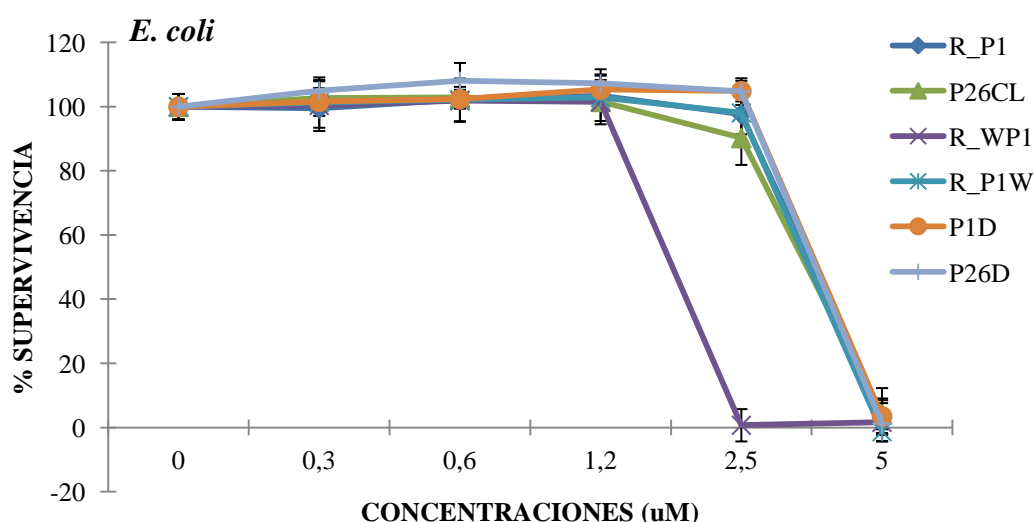


Figura 11. Actividad antibacteriana de los péptidos R_P1, P26CL, R_WP1, R_P1W, P1D y P26D sobre *E. coli*. La curva mostrada esta en términos del porcentaje de supervivencia de las células bacterianas con \pm DE para las concentraciones evaluadas.

5.2.4 CIM de *R. solanacearum*. *R. solanacearum* fue sensible a tres péptidos (P1D, P1X y P26D), el más activo con una CIM de 2,5 μ M fue P1X, los péptidos P1D y P26D presentaron un comportamiento similar con CIMs de 5 μ M (Figura 12). Las CIMs de para cada péptido presentaron diferencias significativas con los demás tratamientos y con el control negativo (Tabla 4). Importante resaltar que a las concentraciones inferiores a 1,2 μ M se presentan porcentajes muy superiores al de las células bacterianas sin tratamiento.

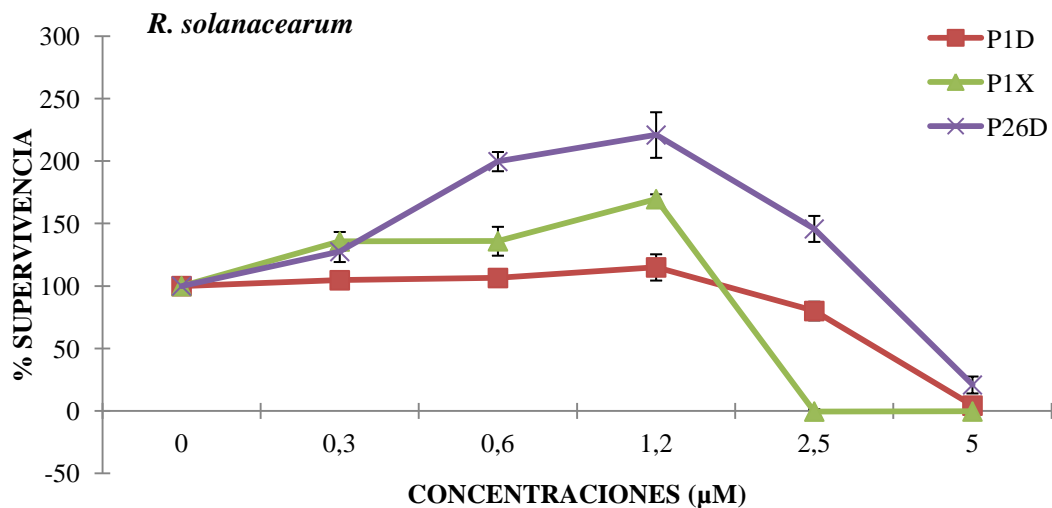


Figura 12. Actividad antibacteriana de los péptidos P1D, P1X y P26D sobre *R. solanacearum*. La curva mostrada está en términos del porcentaje de supervivencia de las células bacterianas con \pm DE para las concentraciones evaluadas.

5.3 CIMs para los hongos

Al igual que con las bacterias, los péptidos sintéticos activos contra *C. albicans* y *F. oxysporum* se les determinó la CIM con las concentraciones 0,3 μM, 0,6 μM, 1,2 μM, 2,5 μM y 5 μM, y los resultados de las CIMs se muestran en la tabla 3.

5.3.1 CIM para *C. albicans*: Cuatro péptidos, P1CL, P1CD, P26CL y Dermaseptina, presentaron actividad contra *C. albicans*, todos presentaron la misma tendencia, donde la supervivencia de las blastoconidias no se vio alterada sino con la concentración 2,5 μM donde se observa que empieza disminuir hasta llegar a ser nula (0%) en la concentración 5 μM de cada péptido (Figura 13). El control negativo y las concentraciones entre 0,3 y 2,5 μM para todos los péptidos activos frente a *C. albicans* presentaron diferencias significativas con las CIM (5 μM) de todos los péptidos, tal y como se muestra en la tabla 8.

Tabla 5. Porcentaje de supervivencia estimada de *C. albicans* y *F. oxysporum* tratados con las diferentes concentraciones de los péptidos sintéticos activos, determinado por ANOVA y la prueba Tukey.

PÉPTIDOS CONCENTRACIONES		<i>C. albicans</i>	<i>F. oxysporum</i>
		PROMEDIO ESTIMADO DEL PORCENTAJE DE SUPERVIVENCIA*	
P26D	0,3 µM		109,5 ^A
	0,6 µM		82,4 ^{BC}
	1,2 µM		3,8 ^F
	2,5 µM		0,3 ^F
	5 µM		0,0 ^F
P26CL	0,3 µM	103,0 ^A	
	0,6 µM	102,8 ^A	
	1,2 µM	101,7 ^A	
	2,5 µM	69,6 ^D	
	5 µM	-1,9 ^E	
P26	0,3 µM		112,2 ^A
	0,6 µM		113,2 ^A
	1,2 µM		101,6 ^{AB}
	2,5 µM		17,7 ^{EF}
	5 µM		1,5 ^F
P1CL	0,3 µM	94,5 ^{ABC}	
	0,6 µM	97,2 ^{AB}	
	1,2 µM	100,4 ^A	
	2,5 µM	77,9 ^{BCD}	
	5 µM	-2,0 ^E	
P1CD	0,3 µM	98,2 ^A	110,5 ^A
	0,6 µM	96,3 ^{ABC}	110,7 ^A
	1,2 µM	99,2 ^A	105,9 ^A
	2,5 µM	75,7 ^{CD}	64,4 ^{CD}
	5 µM	2,5 ^E	2,0 ^F
P1D	0,3 µM		112,0 ^A
	0,6 µM		112,0 ^A
	1,2 µM		47,7 ^D
	2,5 µM		0,2 ^F
	5 µM		0,2 ^F
P1X	0,3 µM		103,2 ^{AB}
	0,6 µM		101,6 ^{AB}
	1,2 µM		103,1 ^{AB}
	2,5 µM		40,8 ^{DE}
	5 µM		-0,6 ^F
DERMA	0,3 µM	94,4 ^{ABC}	106,5 ^A
	0,6 µM	96,5 ^{ABC}	107,5 ^A
	1,2 µM	96,2 ^{ABC}	106,9 ^A
	2,5 µM	90,1 ^{ABC}	80,5 ^{BC}
	5 µM	3,4 ^E	46,6 ^D
CONTROL NEG	0 µM	100,0 ^A	100,0 ^{AB}

*Los promedios con la misma dentro de cada columna no son significativamente diferentes (p <0,005)

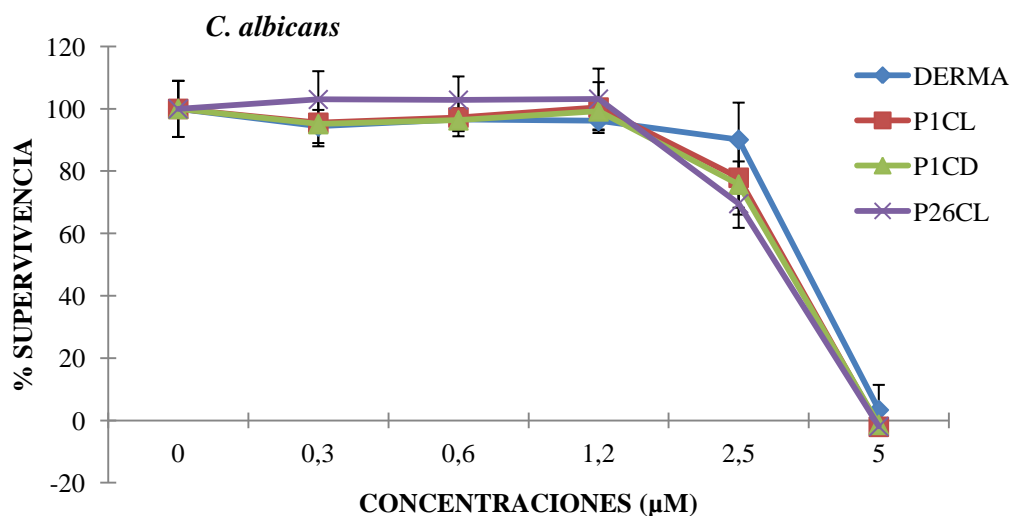


Figura 13. Actividad antifúngica de los péptidos Dermaseptina, P1CL, P1CD y P26CL en *C. albicans* La curva mostrada esta en términos del porcentaje de supervivencia de las células bacterianas con \pm DE para las concentraciones evaluadas.

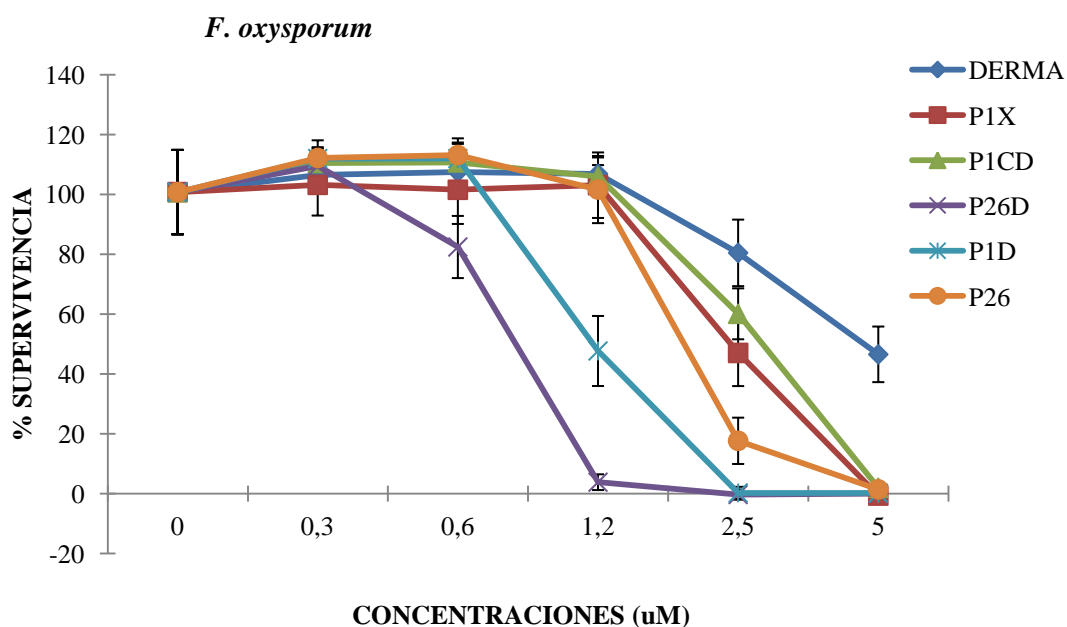


Figura 14. Actividad antifúngica de los péptidos Dermaseptina, P1X, P1CD, P26D, P1D y P26 en *F. oxysporum*. La curva mostrada esta en términos del porcentaje de supervivencia de las células bacterianas con \pm DE para las concentraciones evaluadas.

5.3.2 CIM para *F. oxysporum*. *F. oxysporum* fue el microorganismo más sensible, seis péptidos fueron activos, Dermaseptina, P1X, P1CD, P26D, P1D y P2 (Tabla 3), el péptido más activo fue P26D con una CIM de 1,2 μ M, la más baja de todos los péptidos estudiados,

seguido por P1D con una CIM de 2,5 μ M, los demás péptidos la CIM fue a la máxima concentración evaluada (5 μ M) (Figura 13). En la tabla 9 pueden observar las diferencias estadísticamente significativas entre las CIMs y el control, y las demás concentraciones.

5.4 Actividad hemolítica

Se examinó la actividad hemolítica de los péptidos que fueron activos frente a los microorganismos evaluados en tres concentraciones, 1 μ M, 5 μ M y 15 μ M (Tabla 6). Ninguno de los péptidos evaluados presentó hemólisis a la menor concentración 1 μ M. Tres péptidos fueron hemolíticos, WP1W, P26D y P26, con porcentajes de hemólisis por encima del 90% a la concentración de 15 μ M, 96,3%, 90,5% y 97,1% respectivamente, estos valores no muestran diferencias estadísticamente significativas entre sí, ni con el control positivo, tratamiento con TritonX-100 al 0,1% con el 100% de hemólisis. Sin embargo, WP1W fue el péptido más hemolítico a la concentración de 5 μ M con un porcentaje de 74,7% muy superior a los porcentajes de P26D y P26 a la misma concentración, con porcentajes de hemólisis de 46,7% y 33,8% respectivamente. Los demás péptidos no generaron disrupción de las membranas de los eritrocitarias en ninguna de las concentraciones evaluadas, los porcentajes oscilaron entre 14 y 0%, con diferencias significativas con los péptidos que hemolíticos WP1W, P26D, P26 y el control positivo, eritrocitos tratados con Tritón X-100 (0,1%).

Es importante resaltar que el péptido P1, péptido base para el diseño del resto de péptidos, aunque no mostró actividad antimicrobiana a la concentración fijada para este trabajo, se evaluó su actividad hemolítica, encontrando que no tuvo actividad en ninguna de las concentraciones evaluadas sobre los eritrocitos humanos (Tabla 6).

Tabla 6. Actividad hemolítica de los péptidos sintéticos con actividad antimicrobiana expresada en valores los porcentajes de hemolisis

PEPTIDO	CONCENTRACIÓN (μ M)	% HEMOLISIS	(DE)*
P1CD	15	1,1	($\pm 1,4$) ^{F,G}
	5	1,4	($\pm 2,5$) ^{F,G}
	1	0,8	($\pm 1,4$) ^G
P1X	15	2,4	($\pm 0,9$) ^{F,G}
	5	1,9	($\pm 1,3$) ^{F,G}
	1	2,7	($\pm 1,2$) ^{F,G}
P26	15	97,1	($\pm 5,6$) ^A
	5	33,8	($\pm 7,2$) ^D
	1	0,4	($\pm 0,7$) ^G
P1	15	0,5	($\pm 0,6$) ^G
	5	0,5	($\pm 0,8$) ^G
	1	0,2	($\pm 0,2$) ^G
R_P1	15	1,0	($\pm 1,5$) ^G
	5	2,0	($\pm 2,5$) ^{F,G}
	1	1,0	($\pm 1,5$) ^G
P1CL	15	1,1	($\pm 1,3$) ^G
	5	0,6	($\pm 0,6$) ^G
	1	0,5	($\pm 0,9$) ^G
P26CL	15	14,4	($\pm 5,3$) ^E
	5	2,3	($\pm 2,3$) ^{F,G}
	1	2,2	($\pm 1,8$) ^{F,G}
P26D	15	90,5	($\pm 12,0$) ^A
	5	46,7	($\pm 10,0$) ^C
	1	1,4	($\pm 1,7$) ^{F,G}
P1D	15	4,0	($\pm 2,0$) ^{F,G}
	5	1,2	($\pm 1,3$) ^{F,G}
	1	1,1	($\pm 1,8$) ^G
WP1W	15	96,3	($\pm 6,4$) ^A
	5	74,7	($\pm 1,2$) ^B
	1	2,1	($\pm 1,2$) ^F
DERMA	15	0,0	($\pm 0,0$) ^G
	5	0,2	($\pm 0,5$) ^G
	1	0,8	($\pm 1,1$) ^G
CTRL + Tritón X-100	0,1 %	100,0	($\pm 0,0$) ^A

* DE de las tres concentraciones evaluadas de cada péptido.

El tratamiento con Tritón X-100 (0,1%) fue utilizado como control positivo.

5.5 Permeabilidad de las membranas microbianas

El daño de las membranas plasmáticas fue evidenciado de forma cuantitativa determinando las unidades de fluorescencia en el tiempo y de forma cualitativa por observación microscópica de las células microbianas.

5.5.1 Permeabilidad de membranas bacterianas. El daño de las membranas bacterianas tanto en las mediciones cuantitativa como en las observaciones cualitativas, fue más notorio y fue evidenciado con mayor rapidez en *E. faecalis* VR y *S. aureus* MR bacterias Gram positivas, que en los bacilos Gram negativos como *E. coli* y *R. solanacearum*.

En el caso puntual de *E. faecalis* VR, para la cual solo fue activo el péptido P26D, se puede observar que a partir de una hora, después de la exposición al péptido y con presencia del colorante Sytox green, se observa interiorización del colorante por las bacterias (Figura 15A), lo que indica que hay permeabilización de la membrana. De igual forma ocurrió en el control positivo donde se utilizó Tritón X-100 (0,1%) como agente detergente de la membrana plasmática. En las imágenes se muestra como hay un daño instantáneo de la membrana ya que en el T0 (tiempo cero) ya se observa entrada del colorante en algunas células bacterianas (Figura 15B). Por otro lado, en el control negativo, donde las bacterias no estaban en contacto con ningún agente antimicrobiano, no se observa fluorescencia (Figura 15C).

Estos resultados son corroborados cuando se realizaron las mediciones de las Unidades de Fluorescencia (UF), donde se observa un aumento gradual de la fluorescencia tanto en el tratamiento con P26D, como en el control con Tritón X-100 al 0,1% (Figura 16), lo que no ocurre con el control negativo donde no hay emisión de fluorescencia significativa durante el tiempo evaluado. Cabe resaltar que el tratamiento con Tritón X-100 produce finalmente más emisión de fluorescencia que el tratamiento con P26D.

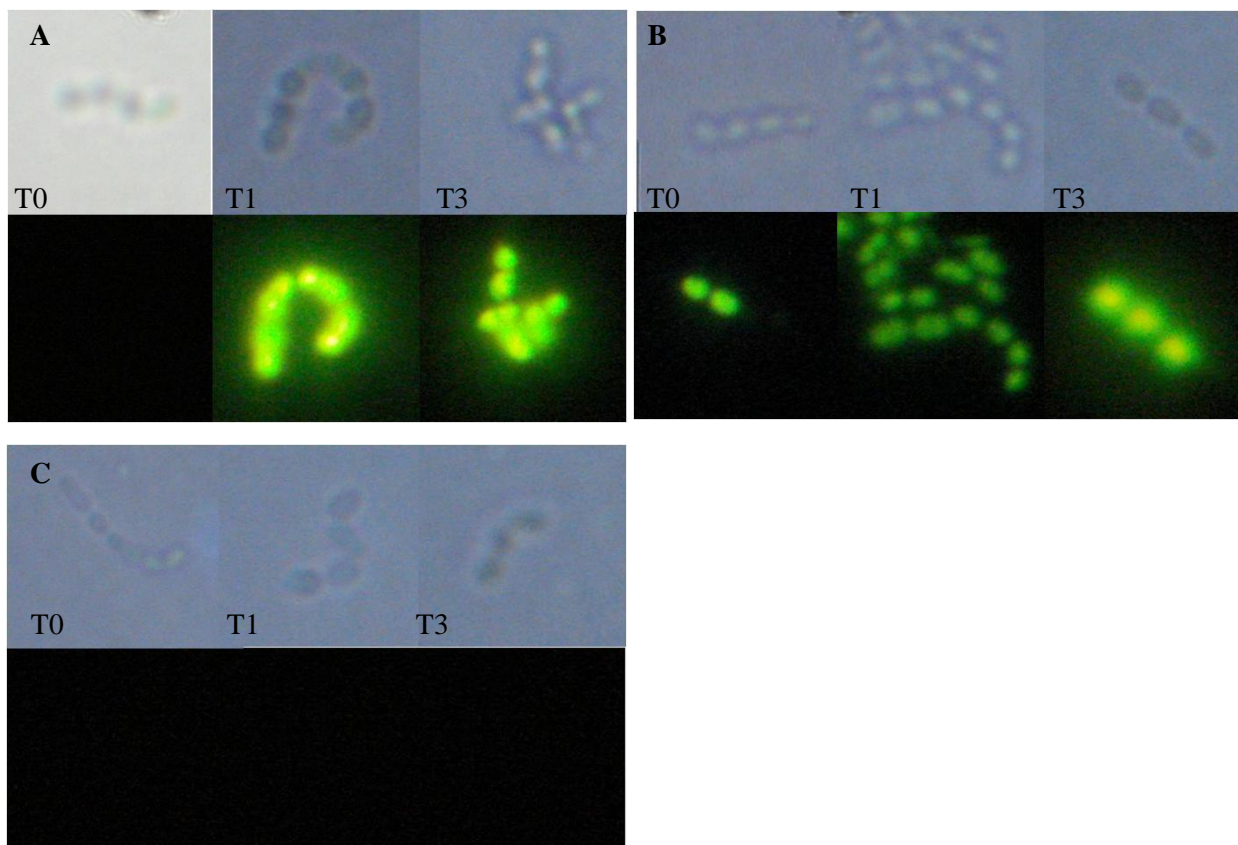


Figura 15. Microscopia de luz y fluorescente con Sytox green (100x) de *E. faecalis* VR. A. Observación del daño de la membrana por la acción de P26D 5 μ M, B. Control positivo (C+), con Tritón X-100 (0,1 %) y C. Control negativo (C-), con PBS y Sytox green. T0. Después de la adición del péptido, T1. Una hora después de la adición del péptido y T3. Tres horas después de la adición del péptido.

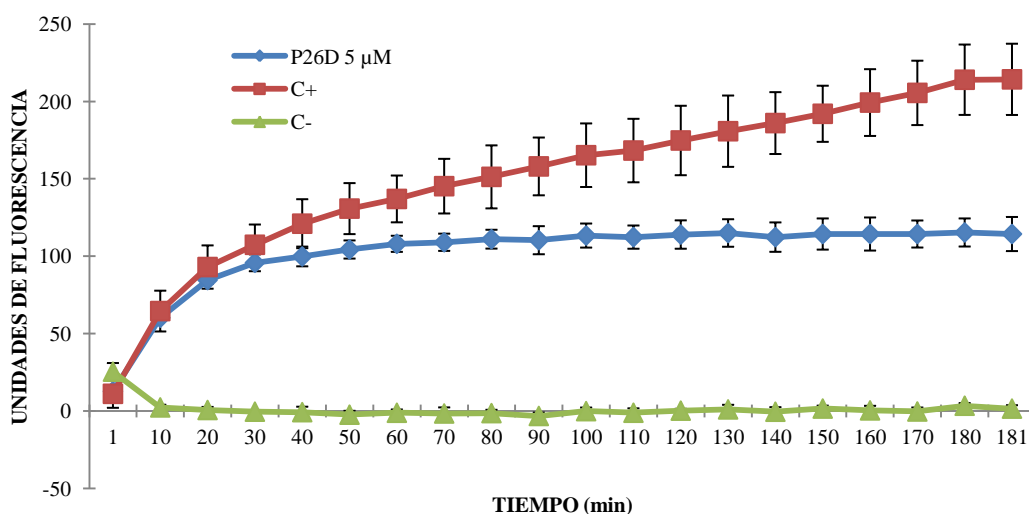


Figura 16. Evaluación cuantitativa de la permeabilización de la membrana de *E. faecalis* VR. Las curvas muestran la detección de las UF emitidas con respecto al tiempo por la acción del péptido P26D (5 μ M). C+, Tratamiento con Tritón X-100 0,1 % y C-, Células con PBS

En *S. aureus* MR, como se había mencionado anteriormente, fueron activos los péptidos P26D, WP1W y P1D. Cuando las células de *S. aureus* MR son tratadas con los tres péptidos a una concentración de 5 μ M, se produce permeabilización notoria de la membrana desde el momento que se ponen en contacto con las bacterias. Se puede observar que desde el T0 ya hay una emisión considerable de fluorescencia. En el tratamiento con P1D, en el T0, se ve claramente que no todas las células presentan fluorescencia, como si ocurre en los otros dos péptidos en el mismo tiempo. A partir del tiempo T1 para todos los péptidos y el tratamiento con Tritón X-100, la fluorescencia es fuerte y se mantiene hasta el último tiempo evaluado (T3) (Figuras 18A, B y C), lo contrario ocurre en el control negativo con PBS donde no se observa fluorescencia en ninguno de los tiempos evaluados (Figuras 18D y E). Al medir las UF emitidas por las células bacterianas de *S. aureus* MR, cuando están en contacto con los tres péptidos (P26D, WP1W y P1D), se puede notar que la fluorescencia empieza a aumentar desde el momento en que están en contacto las células y los péptidos, presentando un comportamiento similar a lo largo del tiempo evaluado en los tres casos (Figura 17). Así mismo en el caso del control positivo se observa el aumento de la fluorescencia desde el primer tiempo evaluado y que sigue en aumento todo el tiempo, diferente al control negativo con PBS donde no hay detección de fluorescencia en ningún momento (Figura 17).

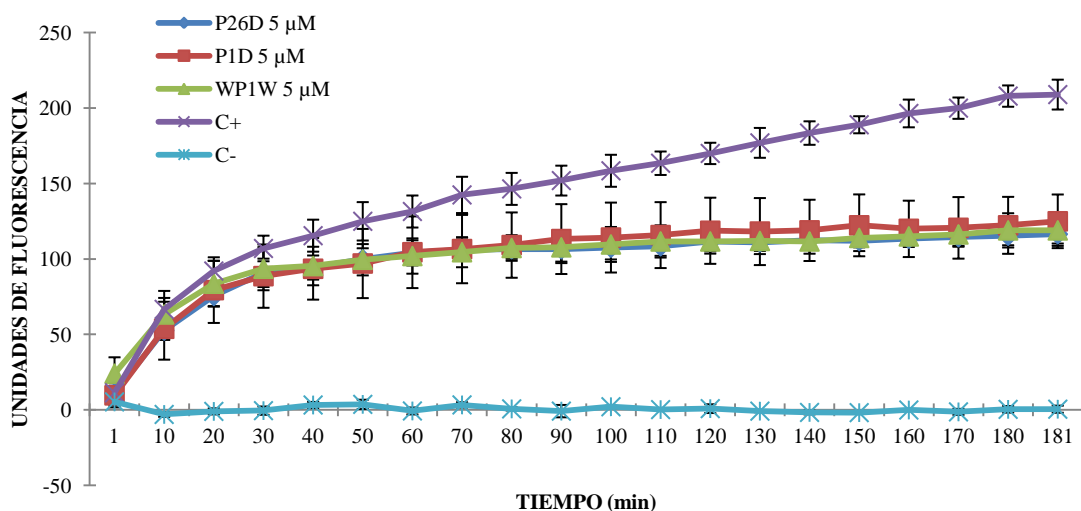


Figura 17. Evaluación cuantitativa de la permeabilización de la membrana de *S. aureus* MR. Las curvas muestran la detección de las UF emitidas con respecto al tiempo por la acción del péptido P26D, P1D Y WP1W todos a 5 μ M. C+, Tratamiento con Tritón X-100 0,1 % y C-, Células con PBS.

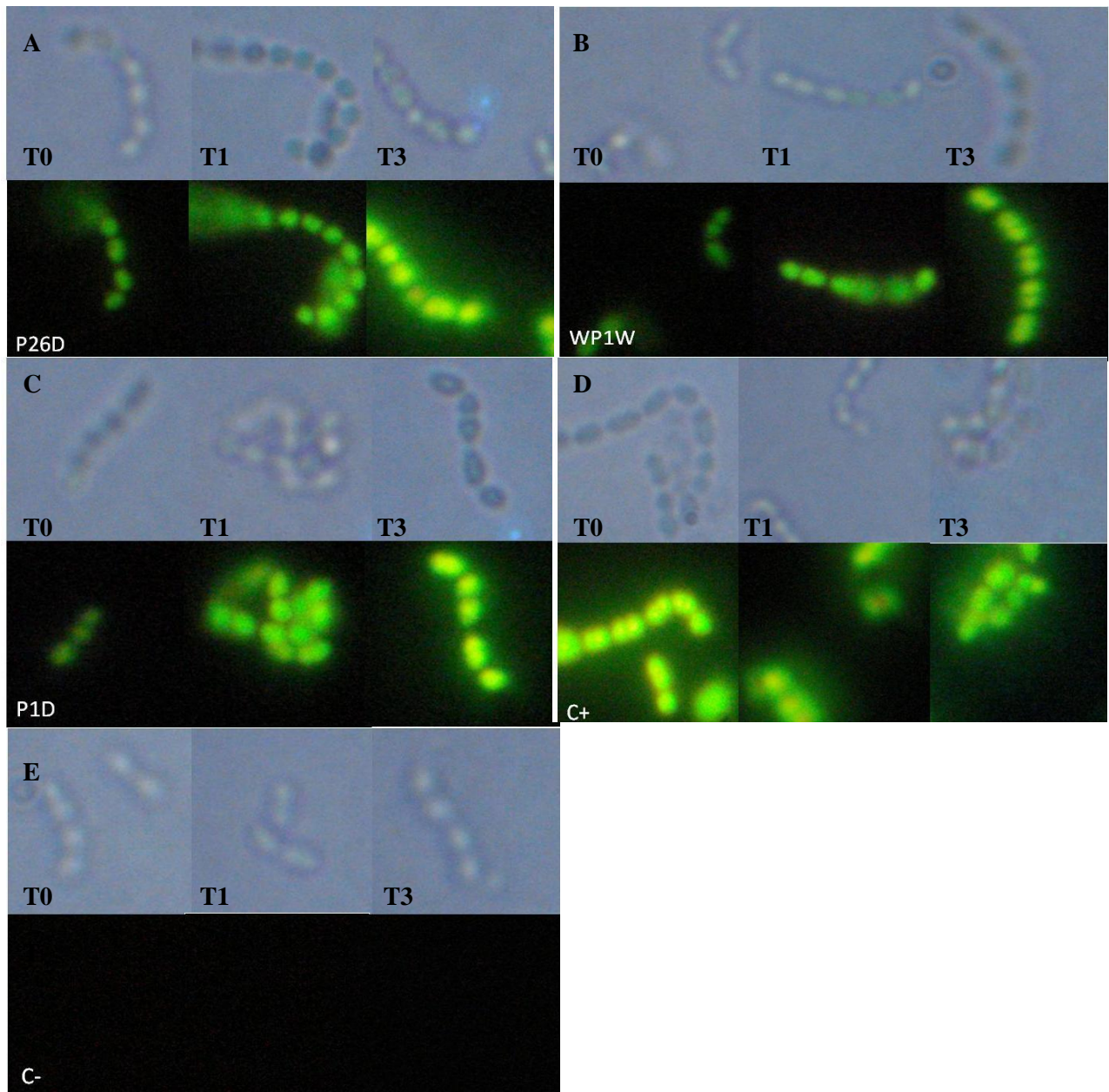


Figura 18. Microscopia luz y fluorescencia con Sytox green (100X) de *S. aureus* MR. A, Observación del daño de la membrana por la acción de P26D 5 μ M. B, Observación del daño de la membrana por la acción de WP1W 5 μ M. C, Observación del daño de la membrana por la acción de P1D 5 μ M. D, Control positivo(C+), con Tritón X-100 (0,1 %) y E, Control negativo (C-), con PBS y Sytox green. T0. Después de la adición del péptido, T1. Una hora después de la adición del péptido y T3. Tres horas después de la adición del péptido.

En las bacterias Gram negativas no todos los péptidos evaluados produjeron daño en las membranas bacterianas y el Tritón X-100 al 0,1% utilizado como control no fue efectivo para producir un daño de las membranas que se tradujera en una emisión considerable de fluorescencia.

En *E. coli* por su parte, se evidenció daño de la membrana plasmática que permitió la entrada de Sytox green por parte de cuatro de los seis péptidos que fueron activos contra esta bacteria (R_P1, R_P1W, R_WP1 y P26D), los otros dos, P26CL y P1D, no mostraron tan claramente una acción directa sobre la membrana. De los péptidos que permeabilizaron la membrana, los que presentaron un mayor efecto fueron R_P1W y R_P1, ya que se observó en ambos casos, una emisión de fluorescencia a partir de una hora post adición de los péptidos, que se intensificó a las tres horas, detectándose también más UF en la evaluación cuantitativa (Figuras 19D, F y 20). Los péptidos P26D y R_WP1 por su parte fueron un poco menos activos, las UF detectadas fueron menores y se observó una menor intensidad en la fluorescencia después de una hora de tratamiento, si los comparamos con la acción notablemente superior de R_P1 y R_P1W. En *E. coli*, el Tritón X-100 no tuvo ningún efecto sobre la membrana, no se detectó ni observó emisión de fluorescencia en el tiempo evaluado. Igualmente ocurrió en el control negativo con PBS donde no hubo permeabilidad de la membrana. Por otra parte, en la medición cuantitativa de las UF, no se detectó emisión de fluorescencia en los tratamientos P26CL y P1D. Sin embargo, en P26CL se observa una débil fluorescencia en el T3 (Figura 19E), pero no es detectada cuando se realizó la medición cuantitativa de las UF, en el caso de P1D no se observó emisión de fluorescencia ni en la evaluación cualitativa, ni cuantitativa (Figuras 19B y 20).

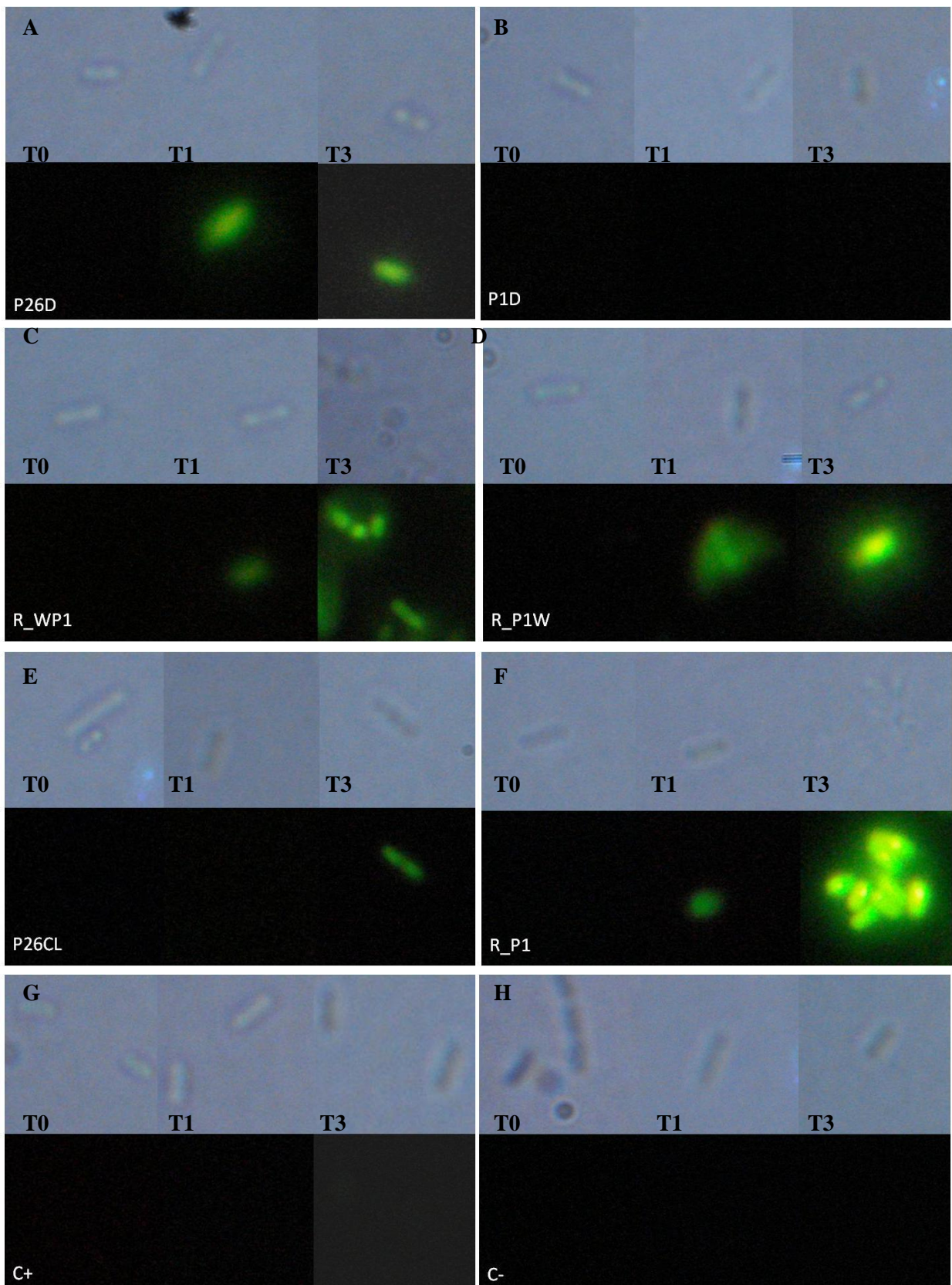


Figura 19. Microscopia de luz y fluorescencia con Sytox green (100X) de *E. coli*. A, Observación de la acción de P26D 5 μ M. B, Observación de la acción de P1D 5 μ M sobre la membrana. C, Observación de la acción de R_WP1 5 μ M. D, Observación de la acción de R_P1W 5 μ M. E, Observación de la acción de P26CL 5 μ M. F, Observación de la acción de R_P1 5 μ M. G, Control (C+), con Tritón X-100 (0,1 %) y H, Control negativo (C-), con PBS y Sytox green. T0. Después de la adición del péptido, T1. Una hora después de la adición del péptido y T3. Tres horas después de la adición del péptido.

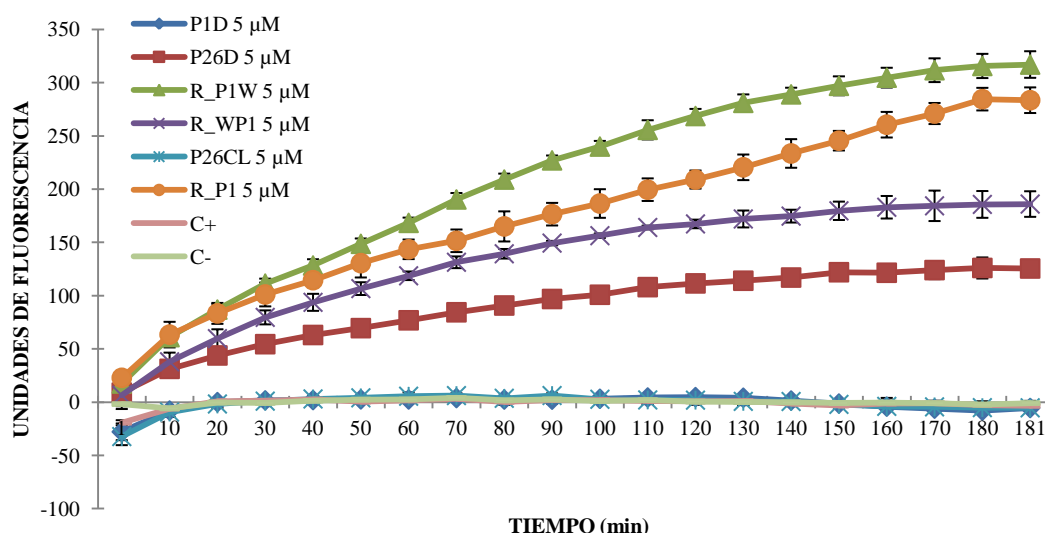


Figura 20. Evaluación cuantitativa de la permeabilización de la membrana de *E. coli*. Las curvas muestran la detección de las UF emitidas con respecto al tiempo por la acción del péptido P26D, P1D, R_P1W, R_WP1, P26CL y R_P1 todos a 5 μ M. C+, Tratamiento con Tritón X-100 0,1 % y C-, Células con PBS

En *R. solanacearum* se evaluó daño sobre la membrana de tres péptidos, de los cuales, hay una clara diferencia de uno con respecto a los demás. El péptido P1D presentó una dinámica muy diferente al resto de péptidos evaluados con todos los microorganismos, ya que la UF detectadas fueron muy superiores, casi el doble o triple de lo que se muestra para el resto de péptidos evaluados; adicionalmente, la fluorescencia solo es detectada después del minuto 100, donde aumenta aceleradamente hasta el último tiempo evaluado (Figura 22), en la evaluación cualitativa se observa que a partir de la hora se ve emisión de fluorescencia y en la última evaluación esta es muy intensa lo que demuestra un daño de la membrana.

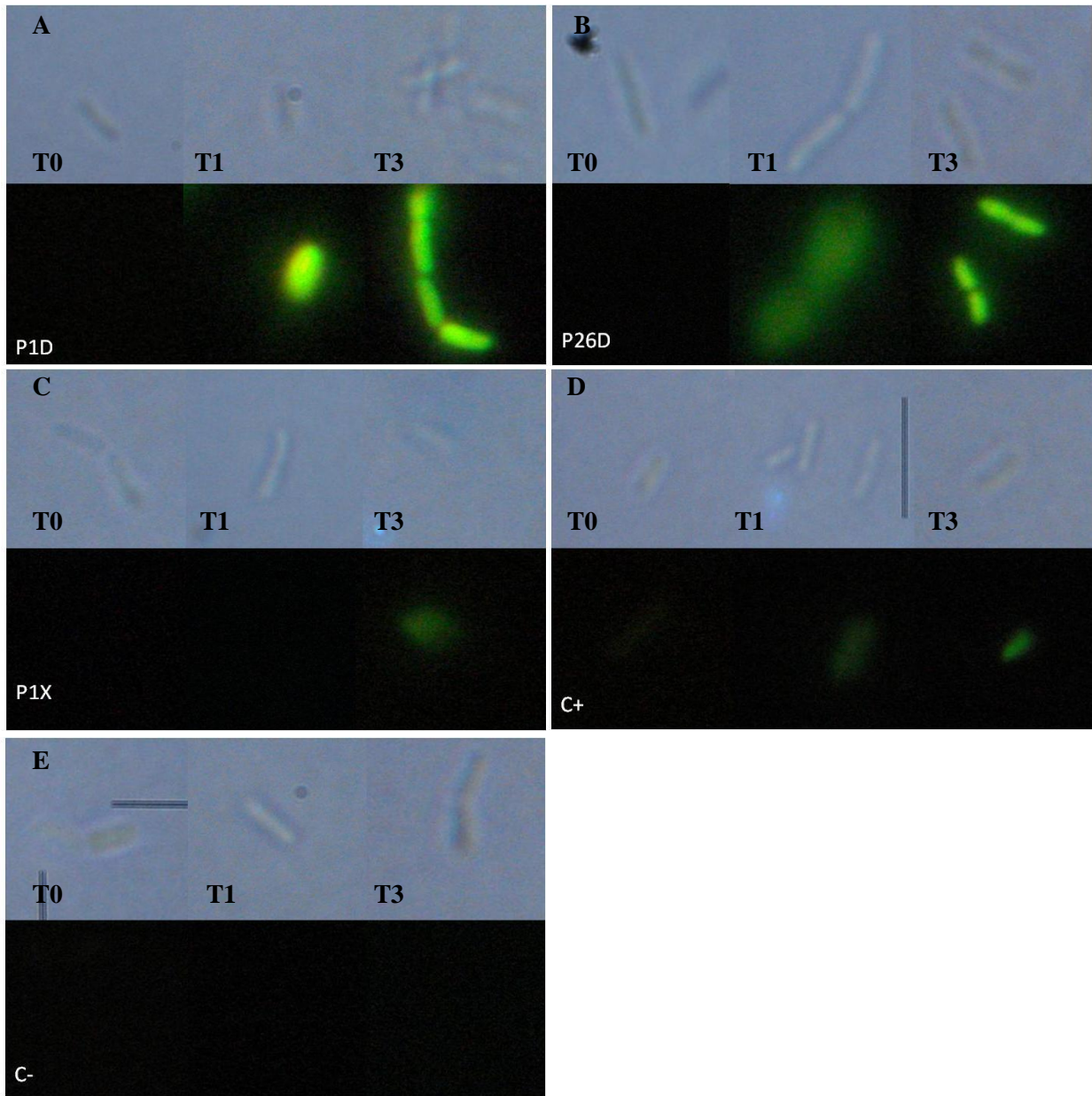


Figura 21. Microscopia de luz y fluorescencia con Sytox green (100X) de *R. solanacearum*. A, Observación de la acción de P1D 5 μ M. B, Observación de la acción de P26D 5 μ M sobre la membrana. C, Observación de la acción de P1X 5 μ M. D, Control (C+), con Tritón X-100 (0,1 %) y E, Control negativo (C-), con PBS y Sytox green. T0. Después de la adición del péptido, T1. Una hora después de la adición del péptido y T3. Tres horas después de la adición del péptido.

El péptido P26D también mostro efecto sobre la membrana plasmática de *R. solanacearum*, pero las UF son menores a las detectadas con P1D y se aumenta después del minuto 150 (Figura 22), sin embargo en las fotos mostradas se puede observar que después de una hora (60 min) post adición del tratamiento, se observa una leve fluorescencia y que en el último

tiempo evaluado esta fluorescencia se intensifica aun mas (Figura 21A). Por otro lado en el tratamiento con los péptidos P1X, no se detectó fluorescencia en las medición cuantitativa en ningún tiempo evaluado (Figura 22), en contraste en las observaciones cualitativas se observa una leve fluorescencia (Figura 21C). Así mismo en el tratamiento con Tritón X-100 no se detectaron UF, pero en las observaciones microscópicas se aprecia una débil fluorescencia (Figuras 21D y 22). En el control negativo con PBS no se detecta, ni se observa, tanto cuantitativamente como cualitativamente, emisión de fluorescencia (Figuras 21E y 22).

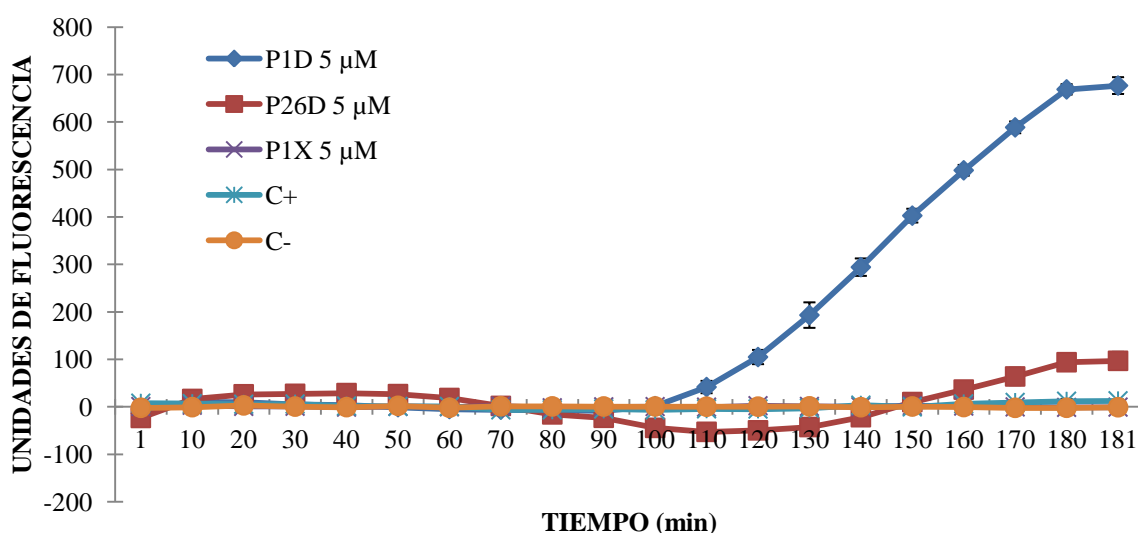


Figura 22. Evaluación cuantitativa de la permeabilización de la membrana de *R. solanacearum*. Las curvas muestran la detección de las UF emitidas con respecto al tiempo por la acción del péptido P26D, P1D y P1X todos a 5 µM. C+, Tratamiento con Tritón X-100 0,1 % y C-, Células con PBS.

5.5.2 Permeabilidad de membranas fúngicas: Igualmente como se describió en las bacterias, los hongos se le evaluó el efecto de los péptidos que fueron activos, sobre las membranas micóticas. Tanto en *C. albicans* como en *F. oxysporum* no se observa un daño evidente en las membranas plasmáticas ya que la medición cuantitativa no hubo detección en ningún momento de UF para ningún péptido y cualitativamente en algunos casos solo se pudo observar una débil fluorescencia, lo que demuestra que la acción de los péptidos sobre los hongos podría ser en parte a nivel intracelular y no estar solo limitado a el contacto con la membrana.

Para *C. albicans* se evaluaron los péptidos P26CL, P1CL, P1CD y Dermaseptina, a los cuales se les había demostrado actividad antimicrobiana y ya se había determinado la CIM. Después de realizar las mediciones cuantitativas de las UF, se encuentra, que en ningún tratamiento con los péptidos mencionados se detectaron emisiones de fluorescencia durante el tiempo del ensayo, lo que indica que posiblemente no hubo una notoria permeabilización de las membranas plasmáticas de las blastoconidias (Figura 23).

No obstante en las observaciones microscópicas se puede evidenciar una débil fluorescencia a partir del T1 para los tratamientos con P1CL, P1CD y Dermaseptina y solo hasta el tiempo T3 (tres horas) (Figuras 24B, C y D), para el péptido P26CL, aparentemente la fluorescencia es muy poca y no es detectada por de forma cuantitativa (Figura 24A). El tratamiento con TritonX-100 no mostro ningún daño considerables en las membranas micóticas ya que no hubo detección de UF, pero al igual que en los tratamientos en la detección cualitativa se puede ver un poca fluorescencia después de una hora de contacto (T1), que también es observada al final de la reacción en el T3 (Figura 24E). Adicionalmente, en el control negativo (células levaduriformes más PBS) no hay detección de UF y tampoco visualización de fluorescencia en las observaciones microscópicas durante los tiempos evaluados (Figura 23).

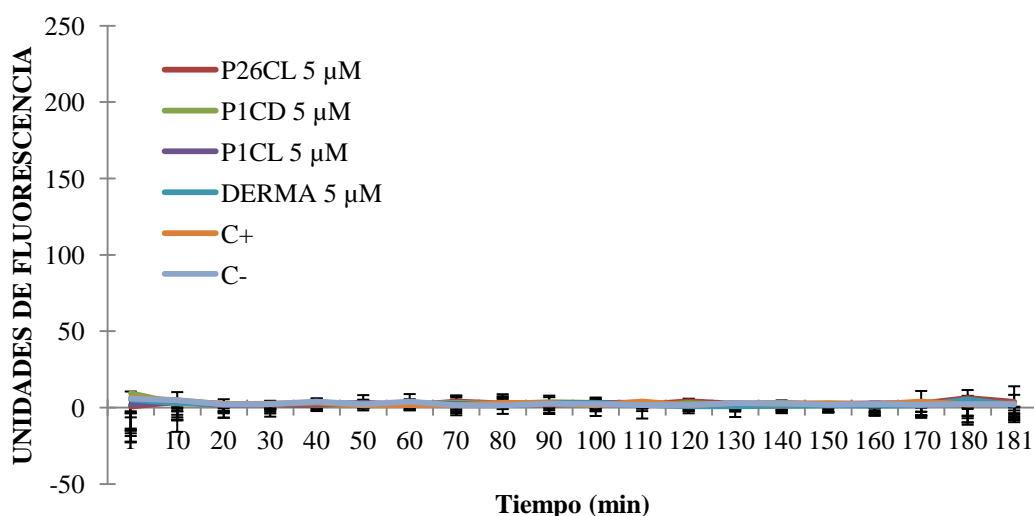


Figura 23. Evaluación cuantitativa de la permeabilización de la membrana de *C. albicans*. Las curvas muestran la detección de las UF emitidas con respecto al tiempo por la acción del péptido P26CL, P1CD, P1CL y Dermaseptina, todos a 5 µM. C+, Tratamiento con Tritón X-100 0,1% y C-, Células con PBS

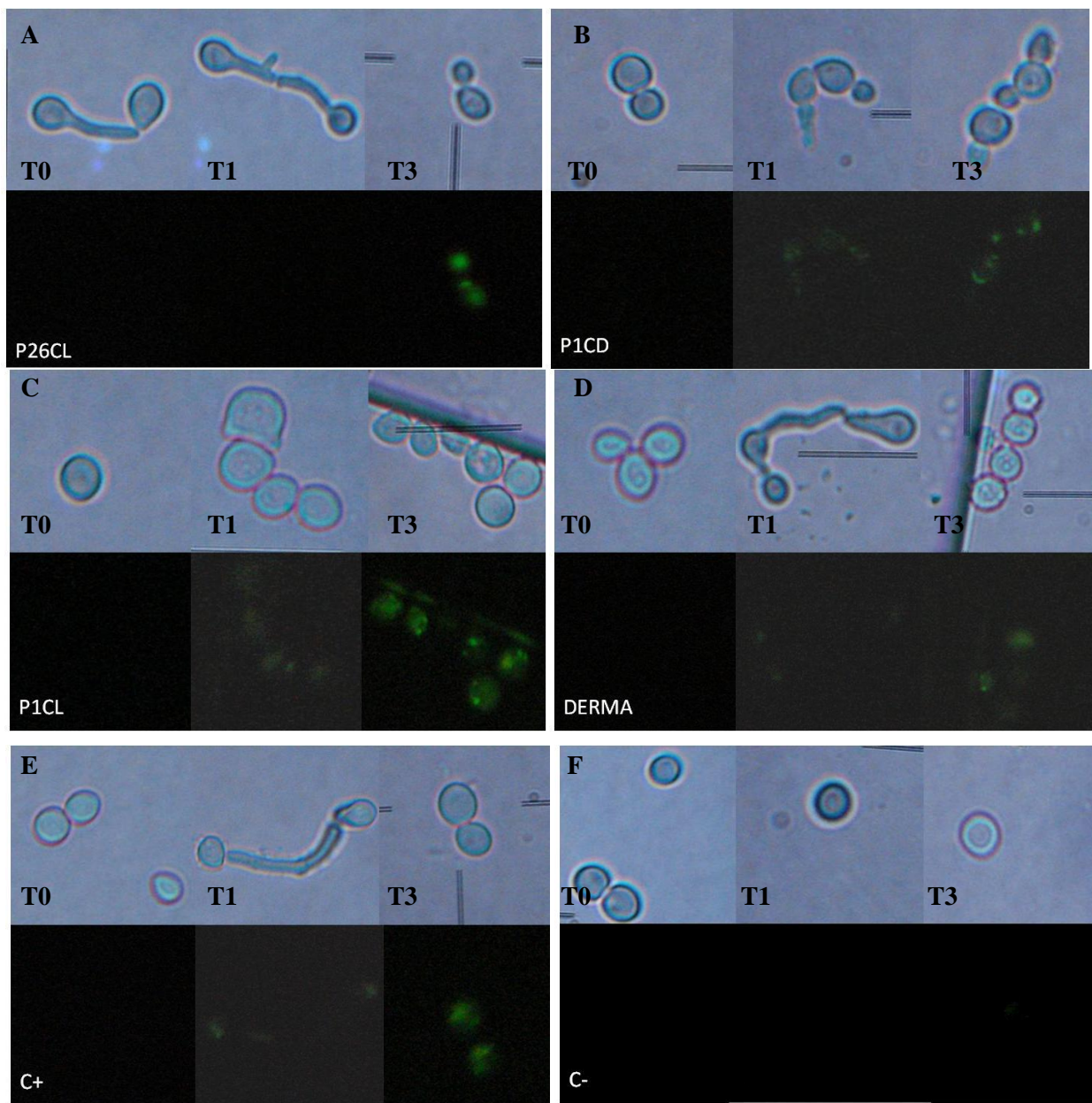


Figura 24. Microscopia de luz y fluorescencia con Sytox green (40X) de *C. albicans*. A, Observación de la acción de P26CL 5 μ M. B, Observación de la acción de P1CD 5 μ M sobre la membrana. C, Observación de la acción de P1CL 5 μ M. D, Observación de la acción de DERMA 5 μ M. E, Control (C+), con Tritón X-100 (0,1 %) y F, Control negativo (C-), con PBS y Sytox green. T0. Después de la adición del péptido, T1. Una hora después de la adición del péptido y T3. Tres horas después de la adición del péptido.

F. oxysporum presentó un comportamiento muy similar a la levadura *C. albicans* ya que los péptidos evaluados P1X, P1CD, P26D, P1D, P26 y Dermaseptina, no mostraron una considerablemente fluorescencia (Figura 26). Al realizar las mediciones cuantitativas de las

UF de los tratamientos con los diferentes péptidos no hay detección de fluorescencia en ningún tiempo evaluado (Figura 25), esto es corroborado con las evaluaciones cualitativas donde se puede observar muy poca fluorescencia en todos los tratamientos, que aparentemente no son detectadas de forma cuantitativa. No obstante, la fluorescencia que se puede notar esta solamente localizada en las hifas y no en las conidias (Figura 26). Adicionalmente se encontró que el Tritón X-100 al 0,1% no mostró una acción importante sobre las membranas del moho, ya que no se detectó fluorescencia y en las observaciones microscópicas solo se aprecia una leve emisión en los tiempos T1y T3 limitados igualmente a las hifas (Figuras 26G y 25). El control negativo por su parte no presento emisión de fluorescencia (Figuras 26H y 25).

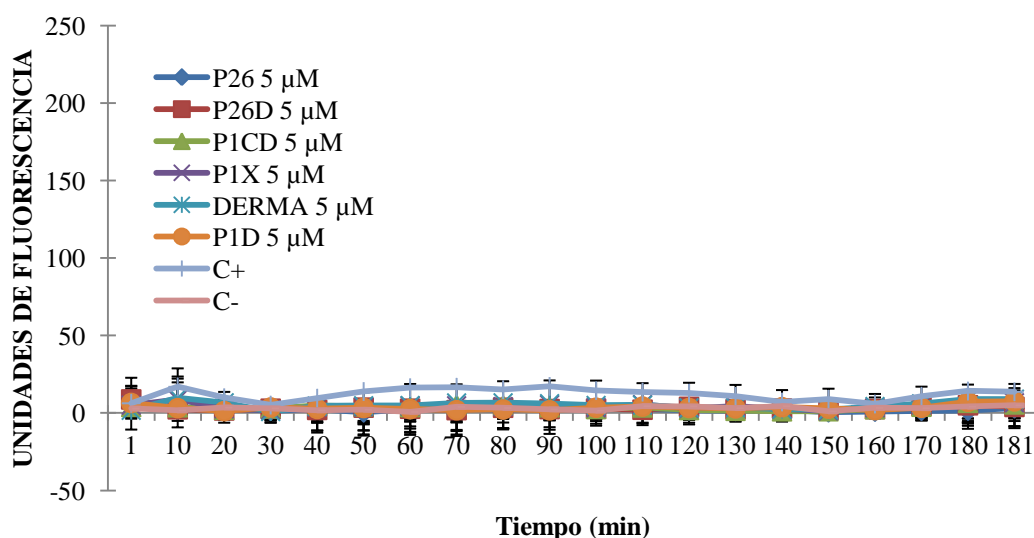


Figura 25. Evaluación cuantitativa de la permeabilización de la membrana de *F. oxysporum*. Las curvas muestran la detección de las UF emitidas con respecto al tiempo por la acción del péptido P26, P26D, P1CD, P1X, P1D y Dermaseptina, todos a 5 µM. C+, Tratamiento con Tritón X-100 0,1% y C-, Células con PBS

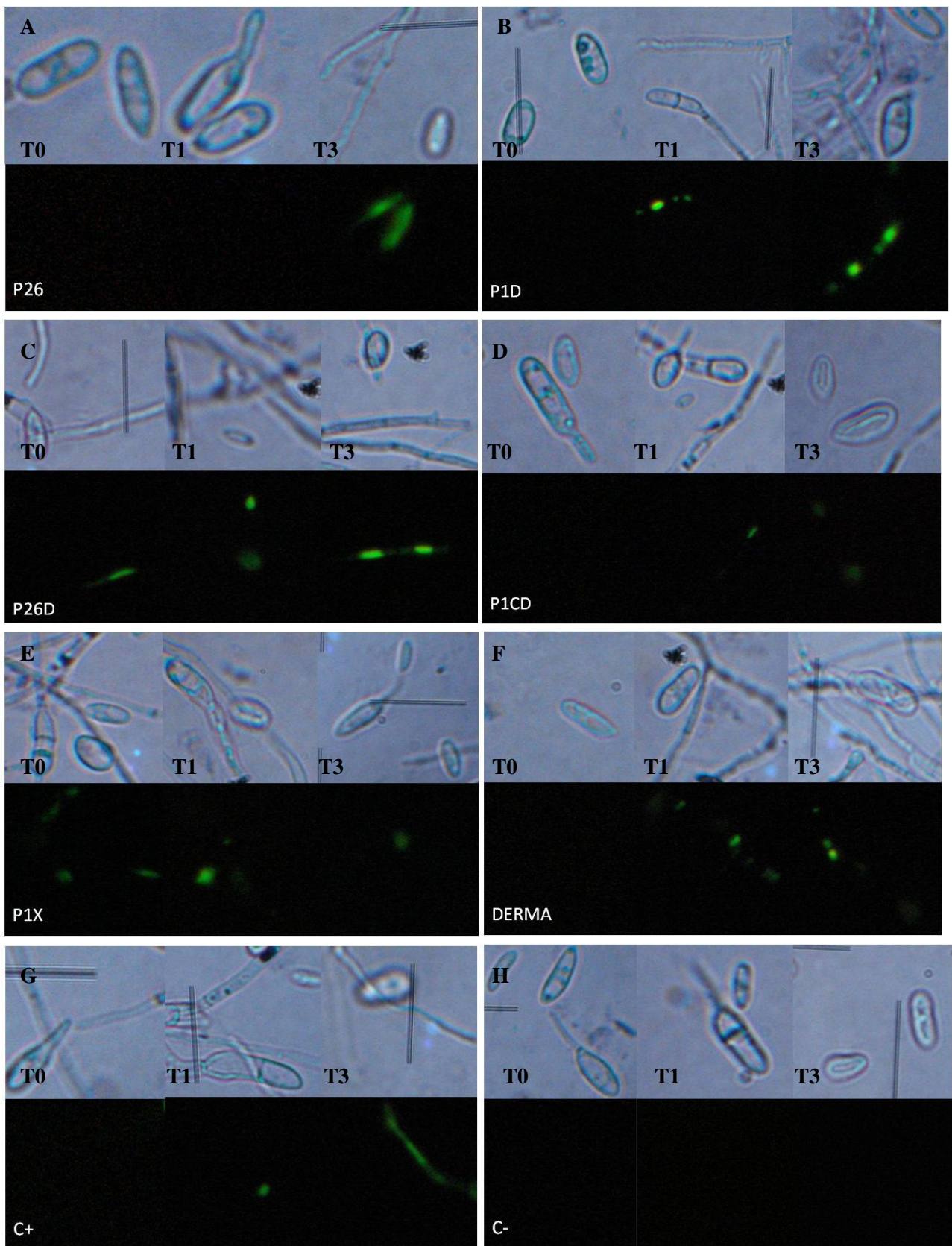


Figura 26. Microscopia de luz fluorescencia con Sytox green (40X) de *F. oxysporum*. A, Observación de la acción de P1D 5 μ M. B, Observación de la acción de P1CD 5 μ M sobre la membrana. C, Observación de la acción de P1X 5 μ M. D, Observación de la acción de DERMA 5 μ M. E, Control (C+), con Tritón X-100 (0,1%) y F, Control negativo (C-), con PBS y Sytox green. T0. Después de la adición del péptido, T1. Una hora después de la adición del péptido y T3. Tres horas después de la adición del péptido.

6. DISCUSIÓN

En varias publicaciones se ha reportado la acción antimicrobiana de péptidos sintéticos diseñados con base en péptidos naturales, con modificaciones, que puedan mejorar la eficacia de las moléculas originales o partiendo de novo, teniendo en cuenta solo las características fisicoquímicas de los aminoácidos. Los PAMs se han propuesto como estrategias promisorias para la generación de nuevos agentes antimicrobianos, teniendo en cuenta que son menos propensos para el desarrollo de resistencia por parte de los patógenos. Hasta el momento no hay reportes de la acción de péptidos derivados de toxinas insecticidas, diferente a la publicación de Segura et al. (2007) y la patente de Lemeshko et al. (2006), donde se describe la actividad biológica del péptido BTM-P1, derivado de la toxina insecticida Cry11Bb sintetizada por *B. thuringiensis* serovar. *medellin*. A partir de este péptido, el grupo de investigación ha sintetizado diferentes variantes, nombrados como péptidos diferentes. En el presente trabajo se evalúa la actividad antimicrobiana de 19 variantes del péptido mencionado, lo que hace de este trabajo una investigación innovadora en la caracterización de compuestos derivados de toxinas insecticidas. Los péptidos variantes de BTM-P1, llamado en este trabajo como P1, se basan en algunos casos en la adición de residuos como triptófano, muy utilizado para en el diseño y síntesis de péptidos de novo, ya que pueden aumentar la hidrofobicidad y mejorar el anclaje del péptido en la membrana, se adicionó al inicio o final de la secuencia base o en ambos extremos, este es el caso de P1W, WP1 y WP1W. Otra modificación es la utilización de D-aminoácidos, remplazando todos los residuos de la secuencia de P1 como el péptido P1D, condición que hace a la molécula menos propensa a la hidrólisis por proteasas. También se evaluaron otras variantes que tienen la adición de 11, 16 y 34 residuos al inicio de la cadena peptídica, residuos que hacen parte de la secuencia natural de la toxina Cry11Bb, en el extremo amino, como son los péptidos P14, PL14 y P13 respectivamente. Los péptidos P1X y P1B contienen pequeños fragmentos de la secuencia base de P1 y la unión de aminoácidos como alanina, leucina y lisina al inicio para en el caso de P1X y final para P1B. En cuanto a los péptidos R_P1W y R_P1 tienen la secuencia en el sentido contrario de los péptidos P1W y P1 respectivamente. Adicionalmente se evaluaron dos péptidos que no están relacionados con las secuencias ya descritas, pues no depende de la secuencia del péptido P1, estos son,

A, diseñado por el grupo, considerando las características de los residuos, utilizando tanto aminoácidos polares como no polares y Dermaseptina S1, descrita por Mor & Nicolas (1994) con actividad antimicrobiana ya comprobada. Es importante mencionar que las secuencias de los péptidos P26, P26D, P26CL, P26C, P1CL y P1CD, no son mostradas por ser información confidencial del grupo de investigación, ya que están en proceso de patentamiento; sin embargo, los péptidos que contienen en su código la letra “D” indica que sus residuos son D-aminoácidos y los que tienen la letra “L” están conformados por L-aminoácidos.

Los resultados mostraron que de los 21 péptidos evaluados, 9 (P26CD, P1, P13, P14, PL14, P1W, WP1, P1B y A) no mostraron actividad antimicrobiana frente a ninguno de los microorganismos evaluados, dentro de este grupo está el péptido P1, que aunque el grupo de investigación había reportado su actividad microbicida sobre bacterias Gram positivas como *S. aureus* y Gram negativas como *E. coli* (Segura et al., 2007), la concentración reportada para obtener inhibición del 100% de las células fue 7,1 μM . En contraste, este estudio fijó como concentración base para definir la eficacia de la acción antimicrobiana 5 μM , por lo que en el trabajo no se reporta actividad antimicrobiana del péptido P1. De los 12 péptidos activos (P26, P26D, P26CL, P1CL, P1CD, P1D, WP1W, P1X, R_P1, R_P1W, R_WP1, DERMA), es interesante considerar que por ejemplo, péptidos como R_P1, R_P1W, R_WP1 mostraron actividad siendo las secuencias en sentido contrario de los péptidos P1, P1W y WP1, lo que revela que fue acertado realizar esta modificación para mejorar la actividad de los péptidos originales, lo que no sucedió con los péptidos P13, P14 y PL14 que no mejoraron su actividad después de adicionarle al péptido base P1 varios residuos al inicio de su secuencia. El péptido más activo fue P26D, ya que tuvo acción microbicida contra cinco de los seis microorganismos evaluados, *E. faecalis* VR, *S. aureus* MR, *R. solanacearum*, *E. coli* y *F. oxysporum* con CIMs de 2,5 μM , 2,5 μM , 5 μM , 5 μM y 1,2 μM respectivamente. Cabe resaltar que la CIM de P26D 1,2 μM frente a *F. oxysporum* fue el valor más bajo encontrado en este trabajo con respecto al resto de péptidos examinados.

Entre los principales patógenos causantes de infecciones complicadas asociadas al cuidado de la salud están, *E. faecalis* VR y *S. aureus* MR y el manejo terapéutico es muy complejo debido evidentemente a sus perfiles de resistencia, es por esto que encontrar nuevos agentes que puedan controlarlos es de gran importancia. En este trabajo encontramos péptidos con acción eficaz contra estos dos patógenos con CIMs inferiores a reportes publicados. Para *E. faecalis* la CIM de P26D fue de 2,5 μ M (8,5 mg/L) mostrando una actividad similar a la reportada por Giacometti et al. (2005) para el péptido Temporina A con una CIM de 8 mg/L. De igual forma, hay varias publicación donde se reporta la potencia de diferentes PAMs sobre cepas de *S. aureus* MR, con CIMs que oscilan entre 1, 36 y >200 μ M (Brouwer et al., 2006). En otra investigación más reciente, Venugopal et al. (2010) encontraron que después de evaluar 22 péptidos sintéticos sobre varias cepas con resistencia a los antibióticos, entre ellas *S. aureus* MR, obtuvieron CIMs entre 17.9 μ M y 220 μ M, que son bastante elevadas al compararlo con los datos obtenidos en el presente trabajo, donde las CIMs para los tres péptidos activos frente a esta cepa fueron, 2,5 μ M P26D, 2,5 μ M P1D y 5 μ M WP1W, lo que demuestra al alto potencial de los péptidos probados. Con respecto al posible modo de acción, se puede inferir que los péptidos que fueron activos frente a las bacterias Gram positivas, *E. faecalis* VR y *S. aureus* MR, muy posiblemente actúan dañando la membrana de forma rápida, ya que en los ensayos de permeabilidad de la membrana plasmática se comprobó que los péptidos P26D frente a *E. faecalis* VR y P26D, P1D y WP1W frente a *S. aureus* MR, permiten la interiorización del colorante fluorescente Sytox green desde el momento entraron en contacto con las células bacterianas, lo que demuestra una alta y rápida eficacia en la actividad antibacteriana, que le confiere una ventaja adicional, ya que los péptidos están menos tiempo en el espacio extracelular expuestos a la acción de las proteasas.

En las bacterias Gram negativas como *E. coli* y *R. solanacearum* mayor número de péptidos fueron activos, 6 y 3 respectivamente, para ambas cepas el tratamiento con Triton X-100 no fue efectivo para muy posiblemente como lo describe Schnaitman, (1971) aunque el Triton X-100 tiene acción de detergente no ionico, algunas membranas bacterianas como la de *E. coli* J-5, son resistentes su acción debido a la estabilización de los iones divalentes de la membrana; sin embargo Cánovas et al., (2005) reporta que para lograr la

permeabilización de la membrana de *E. coli* es necesario una concentración de 2% de Triton X-100.

Para *E. coli* las CIMs fueron 5 μM para R_P1, R_P1W, P26CL, P1D y P26D y 2,5 μM para R_WP1 valores inferiores a los publicados para P1 donde una concentración de 7,1 μM fue necesaria para la inhibición del 100% de las células bacterianas (Segura et al., 2007). Zelezetsky & Tossi (2006) evaluaron parámetros variables de algunos péptidos y encontraron CIM para *E. coli* entre 0,5 μM y >32 μM , por lo tanto se podría decir que son datos similares a los encontrados en este trabajo donde las CIM están entre 2,5 μM y 5 μM . Según las pruebas de permeabilidad de la membrana, no todos los péptidos actúan de la misma forma sobre *E. coli*, es así como los péptidos R_P1, R_P1W, R_WP1 y P26D muestran permeabilización de la membrana, observándose una mayor actividad en los dos primeros, ya que se detecta una mayor emisión de fluorescencia, que es visualizada microscópicamente después de una hora de contacto de los bacilos con los respectivos tratamientos y que se incrementa aún más a las tres horas. Para los dos segundos la fluorescencia detectada no es tan alta y solo se puede observar con claridad a las tres horas postcontacto. Estos resultados indican que probablemente la acción de R_P1, R_P1W, R_WP1 y P26D sobre *E. coli* es directamente sobre la membrana, generando daño irreversible en ella. Inversamente, los péptidos P1D y P26CL no mostraron efectos adversos para las membranas, ya que en los ensayos de permeabilización no se detectaron, ni se observaron emisiones de fluorescencia en todos los tiempos evaluados, lo que permite pensar que el efecto de estos péptidos no es sobre la membrana sino que posiblemente son interiorizados en las células donde se podrían unirse a blancos intracelulares y generar un daño, ya sea alterando la síntesis de proteínas y/o ácidos nucleicos o interviniendo en las rutas metabólicas celulares o de transmisión de señales, este mecanismo descrito con detalle por Jenssen et al., (2006); Teixeira et al., (2012).

El fitopatógeno *R. solanacearum*, causante de la pudrición parda o marchitez bacteriana en cultivos agrícolas productivos como papa y banano es de fácil transmisión, lo dificulta su tratamiento de forma eficaz, casi todas las estrategias para su control son culturales ya que los agroquímicos no son muy eficientes y además son muy tóxicos tanto para el ambiente

como para la salud humana. En este trabajo encontramos que los péptidos P1D, P1X y P26D mostraron una buena actividad antagonista de *R. solanacearum*, con CIMs de 5 μ M, 2,5 μ M y 5 μ M respectivamente, datos interesantes si se comparan con el estudio realizado por Berrocal-Lobo et al. (2002) donde reportaron una EC₅₀ (concentración efectiva para la inhibición del 50% de las células) para la defensina StPTH1 de papa de 25 μ M, muy superior a la reportada por el presente trabajo. Solo los péptidos P1D y P26D provocaron daño en la membrana plasmática ya que se observó fluorescencia después de una hora post contacto con los respectivos tratamientos, por el contrario el péptidos P1X no ocasionó daño en la membrana lo que demuestra un efecto microbicida intracelular.

Hay múltiples publicaciones donde se realiza la evaluación de péptidos utilizando como microorganismo blanco a *C. albicans*, en esta investigación se demostró que los péptidos P1CL, P1CD y P26CL inhibieron el desarrollo de *C. albicans*, todos con una CIM de 5 μ M, considerablemente más baja que la reportada para VS2 y VS3, péptidos sintéticos diseñados de novo, evaluados frente a varios hongos con una CIM de 78,12 μ M y 39,06 μ M respectivamente frente a *C. albicans* (Maurya et al., 2011). Sin embargo, la CIM de la melitina (2,5 μ M) es más baja que la obtenida por los péptidos aquí analizados (Park & Lee, 2009); pero la melitina tiene una desventaja ya que es altamente hemolítica. Igualmente, Zelezetsky & Tossi (2006), reportaron la evaluación de varios análogos del péptido P19 sobre *C. albicans* con CIMs que oscilaron entre 1 μ M y >32 μ M, lo que demuestra, que los péptidos estudiados en este trabajo pueden ser comparados con los reportados de otros autores, como altamente eficaces. A diferencia de las bacterias, en *C. albicans* ningún péptido ocasionó daño considerable de la membrana, aunque se pudo visualizar una leve fluorescencia en las observaciones microscópicas, esto indicaría que la muerte de las blastoconidias no se da por el daño de la integridad de su membrana plasmática. En los estudios de Maurya et al. (2011) y Wong et al. (2011), comprobaron que la muerte en *C. albicans* por los péptidos probados estaba asociada a la acumulación de radicales libres de oxígeno (ROS), los cuales producen deterioro de diversas moléculas como las proteínas, los ácidos nucleicos y los lípidos, muy posiblemente este es el efecto de los péptidos evaluados en este trabajo sobre *C. albicans*. Adicionalmente, se evaluó la

acción del péptido Dermaseptina que presentó actividad fungicida como estaba ya reportado (Mor & Nicolas, 1994)

En *F. oxysporum* fueron activos los péptidos P1X, P1CD, P26D, P1D y P26 con CIMs de 5 μ M, 5 μ M, 1,2 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M respectivamente. Maurya et al. (2011) reportan VS2 con una CIM de 46.50 μ M y para VS3 152 μ M, muy poco activos a los resultados reportados en el presente trabajo. Otros autores hablan de una EC_{50} de 10 μ M y 13 μ M para StN2 y StSN1 respectivamente, péptidos producidos por la planta de la papa, en este trabajo no determinaron el posible modo de acción de StN2 y StSN1, pero mencionan que estos no interactúan con una membrana lipídica artificial (Berrocal-Lobo et al., 2002). Como ocurre en *C. albicans*, el efecto de los péptidos seguramente no es sobre la membrana, muy posiblemente entran al interior de la célula y posteriormente causar daño hasta la muerte.

Tanto en *C. albicans* como en *F.oxysporum* el tratamiento con TritonX-100 no tuvo ningún efecto sobre la permeabilidad de la membrana, muy posiblemente la concentración utilizada en el presente trabajo no fue la adecuada, según Laouar et al. (1996) la permeabilización de membrana de blastoconidias de *Saccharomyces cerevisiae* se deben someter a un tratamiento con Triton X-100 al 0.2%, por otro lado Liu et al. (2012) realiza un estudio para mejorar la absorción de fenol de *Penicillium simplicissimum* mediante la inducción de la permeabilización mediante diferentes agentes, entre esos Triton X-100 al 0.05%, tratamiento que mostro la mejor permeabilización de la membrana del moho, pero la molecula de fenol tiene un menor tamaño que la molecula de sytox green por lo que podría pensarse que los poros generados no fueron lo suficiente grandes que permitieran la entrada del colorante.

El estudio de los PAMs ha surgido como estrategia para la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos diferentes a los antibióticos y antimicóticos en área de la salud o en agricultura y que puedan controlar los patógenos de manera eficaz minimizando los efectos adversos de la utilización de agroquímicos. Para que los PAMs puedan ser usados como tratamiento para enfermedades en humanos, además de todas las pruebas éticas y legales indispensables, deben cumplir con unas características naturales importantes, una de las principales es una baja toxicidad en células sanas de mamíferos, entre ellas los eritrocitos.

En este estudio se probaron todos los péptidos que presentaron actividad antimicrobiana sobre eritrocitos humanos, solo tres de ellos presentaron porcentajes de hemólisis elevados, P26, P26D y WP1W, demás péptidos que presentaron actividad, no presentaron inducción de la hemólisis en eritrocitos humanos con porcentajes iguales o inferiores a 2,4%, por lo que son candidatos promisorios para ser utilizados como alternativas terapéuticas. En contraste el péptido P26 a 15 μ M presentó una hemólisis del 97%, que fue reducida casi a la tercera parte a la concentración de 5 μ M (34%), P26D mostró 90% de hemólisis a 15 μ M y 47% a 5 μ M, mientras que WP1W presentó un 96% de hemólisis a 15 μ M y 75% a 5 μ M; esto indica que la hemólisis es dependiente de la concentración y que el péptido con mayor actividad microbica, P26D, también es uno de los que presenta porcentajes de hemólisis más altos. Es importante considerar que las CIMs para los péptidos P26, P26D y WP1W son menores o iguales a 5 μ M, concentración en la cual el porcentaje de hemólisis es inferior al 50%, excepto para WP1W que tiene una porcentaje de hemólisis mayor (75%), en el caso específico de P26 que solo fue activo frente *F. oxysporum* a una CIM de 5 μ M y su hemólisis a la misma concentración podría ser disminuida mejorando por ejemplo la hidrofobicidad del péptido, en el caso de P26D que fue el péptido más activo ya que presento actividad contra todos los microorganismos evaluados excepto *C. albicans*, las CIMs estuvieron entre 1,2 μ M y 5 μ M, esta ultima para *R. solanacearum*, lo que indica que para los patógenos humanos como *E. coli*, *E. faecalis* VR, *S. aureus* MR y *F. oxysporum* las concentraciones que mostraron hemólisis están muy por debajo de las CIMs para estos patógenos y finalmente podrían ser excelentes candidatos para ser usados como tratamiento para estos patógenos. WP1W por su parte solo fue activo a una CIM de 5 μ M frente a *S. aureus* MR y su hemólisis a esta concentración fue la más alta reportada en este trabajo a la misma concentración, lo que indica que el aumento de la hidrofobicidad otorgado por la adición de los residuos de trptofano al inicio y final de la secuencia disminuyo su especificidad por lo que puede ser activo tanto en membranas bacterianas como en animales.

Dentro de los péptidos activos se puede observar que algunos tienen un mayor espectro de actividad que otros; el péptido P26D por ejemplo, tiene acción antimicrobiana tanto en bacterias Gram positivas (*E. faecalis* VR y *S. aureus* MR) como Gram negativas (*E. coli* y

R. solanacearum), contra hongos tipo mohos como *F. oxysporum* y que también fue activo contra membranas animales como los eritrocitos. El segundo péptido que presentó también una mayor capacidad de acción sobre diversas membranas fue P1D, ya que fue activo contra *S. aureus* MR, *E. coli*, *R. solanacearum* y *F. oxysporum*, pero no fue hemolítico. Estos resultados indican que los péptidos de este trabajo, con más amplio espectro son péptidos conformados con D-aminoácidos, muy posiblemente son más estables al no ser propensos al acción de las proteasas en el espacio extracelular, lo que les brinda una ventaja sobre el resto de PAMs. El resto de los péptidos activos mostraron espectro de actividad antimicrobiana más puntuales y restringidas a un grupo de organismos. Sin embargo, el péptido P1X, aunque fue activo solo contra *R. solanacearum* y *F. oxysporum*, es interesante porque después de P26D y P1D, es el único que tuvo actividad tanto en membranas procariotas como eucariotas y adicionalmente podría ser un candidato para el control de fitopatógenos, ya que coincidentalmente su acción está centrada en los dos patógenos de este tipo evaluados en este trabajo. También es importante resaltar que los péptidos R_P1, R_P1W y R_WP1 que poseen la secuencia en el sentido contrario de P1, P1W y WP1 respectivamente, solo fueron activos contra *E. coli*, lo que demuestra que su perfil de actividad solo está restringido a un tipo de membranas plasmática.

Ahora bien, dentro de los péptidos que no fueron activos, se pueden precisar algunos aspectos, entre ellos que la estrategia de unión de varios residuos al inicio de la secuencia base, en el caso de P13, P14 y PL14 no tuvo una mejoría en la acción antimicrobiana con respecto a P1, así mismo la adición de triptófano (W) al inicio y/o al final del péptido base no mejoró la potencia antimicrobiana. Por otro lado el péptido P1B que es un pequeño fragmento de P1 no tuvo efecto antimicrobiano a la concentración evaluada en este trabajo (5 µM) en ninguno de los microorganismos ensayados, lo que podría indicar que acortar tanto el péptido podría ser una desacertada estrategia, de igual forma el péptido A no mostró actividad sobre ningún microorganismo.

7. CONCLUSIONES

Varios de los péptidos derivados de la toxina insecticida Cry11Bb de *B. thuringiensis* serovar *medellín* mostraron perfiles interesantes de actividad antimicrobiana sobre los microorganismos utilizados en éste estudio. Teniendo en cuenta que se evaluaron diversidad de microorganismos como bacterias de importancia clínica como *E. coli*, *E. faecalis* VR y *S. aureus* MR estos dos últimos resistentes a antibióticos, de importancia en la agricultura como *R. solanacearum*, hongos de importancia con salud como *C. albicans* y el moho oportunista *F. oxysporum* que también es importante como hongo fitopatógeno; demuestra la promisorio utilidad de estos péptidos para el control de este tipo de patógenos que pueda aportar al desarrollo de nuevas estrategias de control, diferentes a las utilizadas tradicionalmente, ya que son altas las tasas de resistencia y toxicidad en el caso de los agroquímicos, que se presentan en la actualidad.

Los péptidos más activos fueron P26D y P1D, conformados con D-aminoácidos, lo que indica que la utilización de D-aminoácidos es una estrategia acertada para aumentar la potencia de actividad del péptido P1. Así mismo, está claro que el posible modo de acción de los péptidos activos sobre las bacterias Gram positivas es del tipo membranólítico, diferente de la actividad de los péptidos activos en los hongos tanto el moho como levadura el mecanismo es no membranólítico, en contraste, en la bacterias Gram negativa el mecanismo parece ser variable.

Para hacer una aproximación más certera del mecanismo de acción es importante realizar en un futuro ensayos que me permitan evidenciar la localización de los péptidos al interior de las células blanco, marcando el péptido con un fluorocromo como FITC, medir las concentraciones de ROS en las células fúngicas, para determinar si la muerte se da por la acumulación de estos componentes, utilizar colorantes vitales en conjunto con Sytox green que me permitan cuantificar la población de células vivas y células muertas y realizar visualizaciones en microscopio electrónico de las células después del tratamiento con los péptidos para evaluar los cambios morfológicos de las células microbianas. Así mismo

sería importante evaluar la estabilidad de los péptidos frente a la acción de proteasas. Igualmente sería de gran importancia evaluar la citotoxicidad de los péptidos sobre células sanas e mamífero diferentes a los eritrocitos.

AGRADECIMIENTOS

A Dios

A mis padres y hermano por siempre estar presente

A mi esposo por su apoyo incondicional en todo momento

A Sergio Orduz Peralta M.Sc., Ph.D., por darme la oportunidad de conocer y aprender sobre este mundo de la ciencia

A Lelia Lavalett M.Sc., por el apoyo brindado y su valiosa ayuda, en el momento oportuno.

A Orville Hernandez Ph.D., Diana Tamayo, M. Sc. y el laboratorio de Biología Molecular de la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), por su colaboración y asesoría para las mediciones cuantitativas de las UF.

A Beatriz Elena Gómez Esp., y la Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia por facilitarme las instalaciones y el microscopio de fluorescencia de la institución.

A Profesor Jairo Quijano Ph.D., por brindarme un espacio valioso para poder desarrollar el presente trabajo

A todos los amigos compañeros por su apoyo constante

A la Universidad Nacional de Colombia por la financiación del proyecto

BIBLIOGRAFIA

- Alberola, J., Rodríguez, A., Francino, O., Roura, X., Rivas, L., Andreu, D., Alberola, J., et al. (2004). Safety and Efficacy of Antimicrobial Peptides against Naturally Acquired Leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(2), 2–5.
- Anderson, J. B. (2005). Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. *Nature Reviews. Microbiology*, 3(7), 547–56.
- Andersson, D. I., & Hughes, D. (2010). Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nature Reviews. Microbiology*, 8(4), 260–71.
- Andersson, D. I., & Hughes, D. (2012). Evolution of antibiotic resistance at non-lethal drug concentrations. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 15(3), 162–172.
- Arenas, G., Guzmán, F., Cárdenas, C., Mercado, L., & Marshall, S. H. (2009). A novel antifungal peptide designed from the primary structure of a natural antimicrobial peptide purified from *Argopecten purpuratus* hemocytes. *Peptides*, 30(8), 1405–11.
- Arias B, I., & Meza L, A. (2004). Shigella y Vibrio cholerae , Perú 1997-2002. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 21(4), 2002–2004.
- Arias, M., Orduz, S., & Lemeshko, V. V. (2009). Potential-dependent permeabilization of plasma membrane by the peptide BTM-P1 derived from the Cry11Bb1 protoxin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*, 1788(2), 532–7.
- Berrocal-lobo, M., Segura, A., Moreno, M., Lo, G., Garcı, F., & Molina, A. (2002). Snakin-2 , an Antimicrobial Peptide from Potato Whose Gene Is Locally Induced by Wounding and Responds to Pathogen Infection 1. *American Society of Plant Biologists*, 128(March), 951–961.
- Bourbon, C., Bry, C., Roggemans, C., Soulard, C., Thizon, C., & Garbay, B. (2008). Use of a real-time polymerase chain reaction thermocycler to study bacterial cell permeabilization by antimicrobial peptides. *Analytical Biochemistry*, 381(2), 279–81.
- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, 3, 238–250.
- Brouwer, C. P. J. M., Bogaards, S. J. P., Wulferink, M., Velders, M. P., & Welling, M. M. (2006). Synthetic peptides derived from human antimicrobial peptide ubiquicidin accumulate at sites of infections and eradicate (multi-drug resistant) *Staphylococcus aureus* in mice. *Peptides*, 27(11), 2585–91.

- Cabrera, Cristina E, Gómez, R. F., Zuñiga, A. E., Corral, R. H., López, B., & Chávez, M. (2011). Epidemiology of nosocomial bacteria resistant to antimicrobials. *Colombia Medica*, 42(1), 117–125.
- Cabrera, Cristina Eugenia, Gómez, R. F., & Zuñiga, A. E. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Medica*, 38, 149–158.
- Chatterjee, J., Laufer, B., & Kessler, H. (2012). Synthesis of N-methylated cyclic peptides. *Nature Protocols*, 7(3), 432–44.
- Chen, W.-J., Delmotte, F., Richard-Cervera, S., Douence, L., Greif, C., & Corio-Costet, M.-F. (2007). At least two origins of fungicide resistance in grapevine downy mildew populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16), 5162–72.
- Chen, Y., Mant, C. T., Farmer, S. W., Hancock, R. E. W., Vasil, M. L., & Robert S., H. (2005). Rational Design of α -Helical Antimicrobial Peptides with. *Journal Biology Chemistry*, 280(13), 12316–12329.
- Chávez, J., Rivas P., P., Sánchez, R., Cuervo, S. I., Parra, C., & Rodríguez, E. (2010). Susceptibilidad in vitro de hongos miceliales aislados de pacientes con cáncer. *Revista Colombiana de Cancerología*, 14(1), 49–50.
- Cole, A. M., Hong, T., Boo, L. M., Nguyen, T., Zhao, C., Bristol, G., Zack, J. a, et al. (2002). Retrocyclin: a primate peptide that protects cells from infection by T- and M-tropic strains of HIV-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(4), 1813–8.
- Cánovas, M., Torroglosa, T., & Iborra, J. L. (2005). Permeabilization of Escherichia coli cells in the biotransformation of trimethylammonium compounds into l-carnitine. *Enzyme and Microbial Technology*, 37(3), 300–308.
- Daher, K. a, Selsted, M. E., & Lehrer, R. I. (1986). Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. *Journal of Virology*, 60(3), 1068–74.
- Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 74(3), 417–33.
- Delcour, A. H. (2009). Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica et biophysica acta*, 1794(5), 808–16.
- Di Marino, S., Scrima, M., Grimaldi, M., D'Errico, G., Vitiello, G., Sanguinetti, M., De Rosa, M., et al. (2012). Antifungal peptides at membrane interaction. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 1–9.

- Díaz, A. (2011). *MECHANISM OF ACTION OF CYCLIC ANTIMICROBIAL PEPTIDES*. Universitat de Girona.
- Epand, R. M., & Vogel, H. J. (1999). Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1462(1-2), 11–28.
- Fjell, C. D., Hancock, R. E. W., & Cherkasov, A. (2007). AMPper: a database and an automated discovery tool for antimicrobial peptides. *Bioinformatics*, 23(9), 1148–55.
- Ganz, T. (2003). Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature reviews. Immunology*, 3(9), 710–20.
- Giacometti, A., Cirioni, O., Kamysz, W., D'Amato, G., Silvestri, C., Del Prete, M. S., Licci, A., et al. (2005). In vitro activity and killing effect of temporin A on nosocomial isolates of *Enterococcus faecalis* and interactions with clinically used antibiotics. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55(2), 272–4.
- Gudmundsson, G. H., Lidholm, D., Ganl, R., & Boman, H. G. (1991). The Cecropin Locus. *The Journal of Biological Chemistry*, 18, 11510–11517.
- Gueguen, Y., Garnier, J., Robert, L., Lefranc, M.-P., Mougnot, I., de Lorgeril, J., Janech, M., et al. (2006). PenBase, the shrimp antimicrobial peptide penaeidin database: sequence-based classification and recommended nomenclature. *Developmental and comparative immunology*, 30(3), 283–8.
- Guiotto, A., Pozzobon, M., Canevari, M., Manganelli, R., Scarin, M., & Veronese, F. M. (2003). PEGylation of the antimicrobial peptide nisin A: problems and perspectives. *IL Farmaco*, 58(1), 45–50.
- Gutierrez, P., & Orduz, S. (2003). PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS : ESTRUCTURA , FUNCIÓN Y APLICACIONES. *Actulidades Biologicas*, 25(78), 5–15.
- Hammami, R., Ben Hamida, J., Vergoten, G., & Fliss, I. (2009). PhytAMP: a database dedicated to antimicrobial plant peptides. *Nucleic Acids Research*, 37(Database issue), D963–8.
- Hammami, R., Zouhir, A., Le Lay, C., Ben Hamida, J., & Fliss, I. (2010). BACTIBASE second release: a database and tool platform for bacteriocin characterization. *BMC Microbiology*, 10, 22.
- Hancock, R. E. (1997). Antibacterial peptides and the outer membranes of gram-negative bacilli. *Journal of Medical Microbiology*, 46(1), 1–3.
- He, J., Eckert, R., Pharm, T., Simanian, M. D., Hu, C., Yarbrough, D. K., Qi, F., et al. (2007). Novel synthetic antimicrobial peptides against *Streptococcus mutans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(4), 1351–8.

- Heuer, H., Schmitt, H., & Smalla, K. (2011). Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Current Opinion in Microbiology*, 14(3), 236–43.
- Hong, S. Y., Park, T. G., & Leec, K.-H. (2001). The effect of charge increase on the specificity and activity of a short antimicrobial peptide. *Peptides*, 22(10), 1669–1674.
- Huang, Y., Huang, J., & Chen, Y. (2010). Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function. *Protein & cell*, 1(2), 143–52.
- Jacqueline, C., Asseray, N., Batard, E., Le Mabecque, V., Kergueris, M.-F., Dube, L., Bugnon, D., et al. (2004). In vivo efficacy of linezolid in combination with gentamicin for the treatment of experimental endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24(4), 393–6.
- Jenssen, H., Hamill, P., & Hancock, R. E. W. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 491–511. 05
- KEITH J, B., & DEREK W, H. (2007). *Fungicide resistance in crop pathogens : how can it be managed ?* (R. St, L. Norton, & M. Chew, Eds.) (1st ed.). Bristol: Fungicide Resistance Action Committee 2007.
- Kanafani, Z. a, & Perfect, J. R. (2008). Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Antimicrobial Resistance*, 46(1), 120–8.
- Kathiravan, M. K., Salake, A. B., Chothe, A. S., Dudhe, P. B., Watode, R. P., Mukta, M. S., & Gadhwhe, S. (2012). The Biology and Chemistry of Antifungal Agents: A Review. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*.
- Kim, D. H., Lee, D. G., Kim, K. L., & Lee, Y. (2001). Internalization of tenecin 3 by a fungal cellular process is essential for its fungicidal effect on *Candida albicans*. *European journal of biochemistry / FEBS*, 268(16), 4449–58.
- Laouar, L., Lowe, K. C., & Mulligan, B. J. (1996). Yeast responses to nonionic surfactants. *Enzyme and Microbial Technology*, 18(6), 433–438.
- Lee, D. G., Kim, H. K., Kim, S. A., Park, Y., Park, S.-C., Jang, S.-H., & Hahm, K.-S. (2003). Fungicidal effect of indolicidin and its interaction with phospholipid membranes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 305(2), 305–310.
- Lee, J., & Lee, D. G. (2008). Structure-antimicrobial activity relationship between pleurocidin and its enantiomer. *Experimental and Molecular Medicine*, 40(4), 370.

- Lee, S.-H., Kim, S.-J., Lee, Y.-S., Song, M.-D., Kim, I.-H., & Won, H.-S. (2011). De novo generation of short antimicrobial peptides with simple amino acid composition. *Regulatory Peptides*, 166(1-3), 36–41.
- Lemeshko, V. (2011). Permeabilization of mitochondria and red blood cells by polycationic peptides BTM-P1 and retro-BTM-P1. *Peptides*, 32(10), 2010–20.
- Lemeshko, V., Guzmán, F., Patarroyo, M. E., Segura, C., & Orduz, S. (2006). Synthetic peptide having an ionophoric and antimicrobial activity.
- Lemeshko, V. V., Arias, M., & Orduz, S. (2005). Mitochondria permeabilization by a novel polycation peptide BTM-P1. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(16), 15579–86.
- Li, Y. (2011). Recombinant Production of Antimicrobial Peptides in Escherichia coli: A Review. *Protein Expression and Purification*, 80(2), 260–267.
- Li, Y., & Chen, Z. (2008). RAPD: a database of recombinantly-produced antimicrobial peptides. *FEMS microbiology letters*, 289(2), 126–9.
- Liu, Z., Zeng, Z., Zeng, G., Li, J., Zhong, H., Yuan, X., Liu, Y., et al. (2012). Influence of rhamnolipids and Triton X-100 on adsorption of phenol by *Penicillium simplicissimum*. *Bioresource technology*, 110, 468–73.
- Marshall, S. H., & Arenas, G. (2003). Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. *Electronic Journal of Biotechnology*, 6(3).
- Matsuzaki, K. (2009). Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788(8), 1687–92.
- Maurya, I. K., Pathak, S., Sharma, M., Sanwal, H., Chaudhary, P., Tupe, S., Deshpande, M., et al. (2011). Antifungal activity of novel synthetic peptides by accumulation of reactive oxygen species (ROS) and disruption of cell wall against *Candida albicans*. *Peptides*, 32(8), 1732–40.
- Mor, a, & Nicolas, P. (1994). Isolation and structure of novel defensive peptides from frog skin. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 219(1-2), 145–54. Retrieved from
- Muñoz Rodríguez, A. (2008). *Caracterización de distintos Péptidos Antimicrobianos con actividad frente a hongos Fitopatógenos de interés Agroalimentario*. Universidad Politécnica de Valencia.
- Nguyen, L. T., Chan, D. I., Boszhard, L., Zaat, S. a J., & Vogel, H. J. (2010). Structure-function studies of chemokine-derived carboxy-terminal antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1798(6), 1062–72.

- Nizet, V. (2006). Antimicrobial peptide resistance mechanisms of human bacterial pathogens. *Current Issues in Molecular Biology*, 8(1), 11–26.
- Orduz, S., Realpe, M., Arango, R., Murillo, L. a, & Delécluse, A. (1998). Sequence of the cry11Bb11 gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. medellin and toxicity analysis of its encoded protein. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1388(1), 267–72.
- Park, C., & Lee, D. G. (2009). Fungicidal effect of antimicrobial peptide arenicin-1. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788(9), 1790–6. doi:10.1016/j.bbamem.2009.06.008
- Pfaller, M. a. (2012). Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *The American Journal of Medicine*, 125(1 Suppl), S3–13.
- Qi, X., Zhou, C., Li, P., Xu, W., Cao, Y., Ling, H., Ning Chen, W., et al. (2010). Novel short antibacterial and antifungal peptides with low cytotoxicity: Efficacy and action mechanisms. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 398(3), 594–600.
- Rathinakumar, R., Walkenhorst, W. F., & Wimley, W. C. (2009). Broad-spectrum antimicrobial peptides by rational combinatorial design and high-throughput screening: the importance of interfacial activity. *Journal of the American Chemical Society*, 131(22), 7609–17.
- Reddy, K. V., Yedery, R. D., & Aranha, C. (2004). Antimicrobial peptides: premises and promises. *Inter. J. Antim. Agents.*, 24, 536–547.
- Rivas P., P., Cuervo, S. I., Sánchez, R., & Martínez, M. (2010). Tendencia en la frecuencia y susceptibilidad in vitro a agentes antifúngicos de aislamientos de *Candida* spp. a partir de hemocultivos en pacientes con cáncer (1999-2008) Resúmenes de la Jornada de Investigación "Diagnostico y tratamiento del cáncer en Col. *Revista Colombiana de Cancerología* (Vol. 14, pp. 47–51).
- Rodríguez-badillo, R., Arellano, G. C., González, F., Velázquez, M. S., Escalante, S. A., & Barrón, D. M. (2011). Programa de monitoreo bacteriológico y de regulación de uso de antibióticos. Experiencia en una unidad de cuidados intensivos. *Revista de la Asociación Mexicana de Medicina*, XXV, 87–96.
- Saido-Sakanaka, H., Ishibashi, J., Momotani, E., Amano, F., & Yamakawa, M. (2004). In vitro and in vivo activity of antimicrobial peptides synthesized based on the insect defensin. *Peptides*, 25(1), 19–27.
- Schnaitman, C. A. (1971). Effect of Ethylenediaminetetraacetic Acid, Triton X-100, and Lysozyme on the Morphology and Chemical Composition of Isolated Cell Walls of *Escherichia coli*. *American Society for Microbiology*, 108(I), 553–563.

- Seebah, S., Suresh, A., Zhuo, S., Choong, Y. H., Chua, H., Chuon, D., Beuerman, R., et al. (2007). Defensins knowledgebase: a manually curated database and information source focused on the defensins family of antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Research*, 35(Database issue), D265–8.
- Segura, C., Guzmán, F., Salazar, L. M., Patarroyo, M. E., Orduz, S., & Lemeshko, V. (2007). BTM-P1 polycationic peptide biological activity and 3D-dimensional structure. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 353(4), 908–14.
- Som, A., Vemparala, S., Ivanov, I., & Tew, G. N. (2008). Synthetic mimics of antimicrobial peptides. *Biopolymers*, 90(2), 83–93.
- Spaar, A., Münster, C., & Salditt, T. (2004). Conformation of peptides in lipid membranes studied by x-ray grazing incidence scattering. *Biophysical Journal*, 87(1), 396–407.
- Speck-Planche, A., Kleandrova, V. V., Luan, F., & Cordeiro, M. N. D. S. (2012). Predicting multiple ecotoxicological profiles in agrochemical fungicides: a multi-species chemoinformatic approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 80, 308–13.
- Takahashi, D., Shukla, S. K., Prakash, O., & Zhang, G. (2010). Structural determinants of host defense peptides for antimicrobial activity and target cell selectivity. *Biochimie*, 92(9), 1236–41.
- Teixeira, V., Feio, M. J., & Bastos, M. (2012). Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Progress in Lipid Research*, 51(2), 149–77.
- Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American Journal of Medicine*, 119(6 Suppl 1), S3–10; discussion S62–70.
- Thomas, S., Karnik, S., Barai, R. S., Jayaraman, V. K., & Idicula-Thomas, S. (2010). CAMP: a useful resource for research on antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Research*, 38(Database issue), D774–80.
- Téllez, G. A., & Castaño, J. C. (2010). Péptidos antimicrobianos. *Infectio*, 14(1), 55–67.
- Vandeputte, P., Ferrari, S., & Coste, A. T. (2012). Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *International Journal of Microbiology*, 2012, 713687.
- Venugopal, D., Klapper, D., Srouji, A. H., Bhonsle, J. B., Borschel, R., Mueller, A., Russell, A. L., et al. (2010). Novel antimicrobial peptides that exhibit activity against select agents and other drug resistant bacteria. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18(14), 5137–47.
- Wade, D., & Englund, J. (2002). Synthetic antibiotic peptides database. *Protein and peptide letters*, 9(1), 53–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12141924>

- Wang, C. K. L., Kaas, Q., Chiche, L., & Craik, D. J. (2008). CyBase: a database of cyclic protein sequences and structures, with applications in protein discovery and engineering. *Nucleic Acids Research*, 36(Database issue), D206–10.
- Wang, G. (2010). *Antimicrobial peptides: discovery, design and novel therapeutic strategies*. (G. Wang, Ed.) (1st ed.). Wallingford: Cabi.
- Wang, Guangshun, Li, X., & Wang, Z. (2009). APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Research*, 37(Database issue), D933–7.
- Whitmore, L., & Wallace, B. (2004). The Peptaibol Database: a database for sequences and structures of naturally occurring peptaibols. *Nucleic Acids Research*, 32(Database issue), D593–4.
- Wimley, W. C. (2010). Describing the Mechanism of Antimicrobial Peptide Action with the Interfacial Activity Model. *ACS Chemical Biology*, 5(10), 905–917.
- Wiradharma, N., Khoe, U., Hauser, C. a E., Seow, S. V., Zhang, S., & Yang, Y.-Y. (2011). Synthetic cationic amphiphilic α -helical peptides as antimicrobial agents. *Biomaterials*, 32(8), 2204–12.
- Wong, J. H., Ng, T. B., Legowska, A., Rolka, K., Hui, M., & Cho, C. H. (2011). Antifungal action of human cathelicidin fragment (LL13-37) on *Candida albicans*. *Peptides*, 32(10), 1996–2002.
- Yeaman, M. R., & Yount, N. Y. (2003). Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological Reviews*, 55(1), 27–55.
- Zanetti, M. (2004). Cathelicidins , multifunctional peptides of the innate immunity. *Journal of Leukocyte Biology*, 75(January), 39–48.
- Zasloff, M. (1987). Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Microbiology*, 84(15), 5449–5453.
- Zelezetsky, I., & Tossi, A. (2006). Alpha-helical antimicrobial peptides--using a sequence template to guide structure-activity relationship studies. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758(9), 1436–49.
- Zerbini, E., Andreu, D., Tonarelli, G., & Sequeira, M. D. (2006). Sensibilidad in vitro de micobacterias a dos péptidos sintéticos híbridos con actividad antimicrobiana. *Revista Argentina de Microbiología*, 38(4), 221–223.
- Zhao, H. (2003). *Mode of Action of Antimicrobial Peptides*. University of Helsinki.